

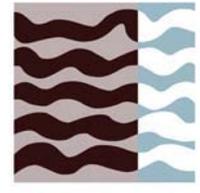


Universidad
Politécnica
de Cartagena



UPCT

Escuela Técnica Superior de
Ingeniería Agronómica



ETSIA

*Máster Universitario
en Técnicas Avanzadas en Investigación
y Desarrollo Agrario y Alimentario*

Optimización del protocolo de Obtención de
Dobles Haploides en Cucumis melo

Autor: D Alberto Pedrero Méndez

Dirección: Dña María Ángeles Ferrer Ayala

Codirección: Dña Maria José Clemente Moreno

Cartagena, noviembre de 2020



Declaración de Honestidad Académica

El alumno D. **Alberto Pedrero Méndez**, con DNI XXXXXXXXXX

como autor del TFE de título **Optimización del protocolo de Obtención de Dobles Haploides en Cucumis melo**

dirigido por Dña. **María Ángeles Ferrer Ayala**

para la obtención del título

- Grado en Ingeniería Agroalimentaria y de Sistemas Biológicos
- Máster Universitario en Ingeniería Agronómica
- Máster Universitario en Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario

DECLARA:

- Que el mencionado TFE es íntegramente de su autoría.
- Que se trata de un trabajo original e inédito en el que no existe plagio.
- Que en todo momento se respeta la propiedad intelectual y en ningún caso se han utilizado como propios resultados ni materiales obtenidos o generados por otros autores.
- Que los resultados y materiales realizados por otros autores han sido debidamente identificados en la memoria.
- Que se ha aplicado al texto íntegro del TFE el control antiplagio que establece la *Normativa de Trabajos Fin de Estudios en la ETSIA*, y acompaña esta declaración de las páginas primera y última del informe obtenido de Turnitin a través de Aul@Virtual.
- Qué los directores del TFE conocen y han dado el visto bueno a los resultados del control antiplagio y, en su caso, han informado en la forma que indica el documento *Política de Calidad y Código de Buenas Prácticas*.

Y para que así conste, firma la presente declaración en,

Cartagena, a 15 de noviembre de 2020

PEDRERO
MENDEZ
ALBERTO -
23333392F

Firmado digitalmente
por PEDRERO
MENDEZ ALBERTO -
23333392F
Fecha: 2020.11.15
18:51:27 +01'00'

Fdo. **Alberto Pedrero Méndez**

Nota aclaratoria

El objetivo inicial del presente Trabajo Fin de Máster era realizar una serie de ensayos experimentales para optimizar el proceso de duplicación cromosómica en plantas haploides de *Cucumis melo* L., englobado dentro de la técnica de los dobles haploides. Para ello, se diseñaron varios experimentos, entre los que se encontraba en primer lugar, un experimento para evaluar la eficacia de dos antimitóticos a diferentes concentraciones y diferentes tiempos de incubación utilizando varias variedades de melón. Seguidamente, se pretendía evaluar el efecto de diferentes reguladores del crecimiento durante el proceso de regeneración, con el objetivo de aumentar la eficacia del proceso de obtención de dobles haploides.

Sin embargo, debido a la situación de pandemia vivida durante estos últimos meses, la realización experimental fue interrumpida durante las primeras semanas con solo un experimento inicial. Ante la imposibilidad de continuar la parte experimental, pero con la intención de no abandonar el trabajo inicial ya realizado, el TFM se replanteó a un modelo mixto en el que se incluye tanto una revisión bibliográfica completa de la técnica en estudio, como una parte experimental que recoge los resultados obtenidos antes de la pandemia.

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
1.1. El melón: importancia agronómica y mejora genética clásica.....	3
1.2. Mejora biotecnológica: el cultivo “ <i>in vitro</i> ”.....	4
1.3. Mejora biotecnológica en melón.....	6
2. Objetivos e hipótesis.....	8
2.1. Revisión bibliográfica.....	8
2.2. Ensayo experimental.....	9
3. Revisión bibliográfica: dobles haploides en la mejora genética vegetal .	10
3.1. Metodología.....	10
3.2. Introducción: inicios de la técnica de generación de dobles haploides	10
3.3. Métodos de obtención de plantas haploides.....	11
a. Métodos “ <i>in vitro</i> ”. Androgénesis.....	12
b. Métodos “ <i>in vitro</i> ”. Ginogénesis.....	14
c. Métodos “ <i>in vivo</i> ”. Partenogénesis.....	16
d. Métodos “ <i>in vivo</i> ”. Líneas inductoras haploides.....	18
3.4. Duplicación cromosómica de las plantas haploides.....	19
3.5. Métodos para determinar el nivel de plodía.....	22
3.6. Aplicaciones, ventajas y desventajas de la técnica de DHs.....	23
4. Ensayo Experimental: Optimización del protocolo de duplicación cromosómica.....	25
4.1. Metodología.....	25
4.2. Resultados.....	29
4.4. Discusión.....	34
5. Conclusiones.....	36
6. Bibliografía.....	37
7. Anexos.....	44

Resumen

El melón (*Cucumis melo* L.) es una planta de gran interés agronómico en España y particularmente en la Región de Murcia, tanto por la superficie destinada a su cultivo como por el volumen de las exportaciones realizadas. En los programas de mejora genética clásica del melón se requieren líneas parentales con las que luego generar híbridos comerciales. El proceso de obtención de estos parentales se puede acelerar mediante el uso de la técnica de obtención de dobles haploides, en la que se consiguen líneas 100% homocigóticas. En melón, sin embargo, los protocolos descritos de esta técnica tienen una baja eficiencia debido por un lado a la baja inducción de plantas haploides y a la baja eficacia en el proceso de duplicación cromosómica. En el presente trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica de la técnica de generación de dobles haploides en sus principales etapas, y posteriormente se ha realizado un ensayo experimental para evaluar la eficacia de dos antimitóticos (colchicina y amiprofos-metil (APM)) a diferentes concentraciones y diferentes tiempos de incubación. Los resultados mostraron que la eficacia de la técnica depende fuertemente del genotipo. Así mismo, se observó que los mayores porcentajes de brotación se obtuvieron con colchicina a una concentración de 0,5 mM, tratamiento considerado "control". Mayores concentraciones de antimitótico presentaban una menor brotación. De esta forma, las condiciones ensayadas no fueron suficientes para mejorar el proceso de duplicación cromosómica, y será necesario realizar más experimentos con un mayor tamaño muestral para cada concentración, sin comprometer la brotación y regeneración.

Palabras clave: amiprofos-metil, colchicina, líneas dobles haploides, melón.

Abstract

Muskmelon (*Cucumis melo* L.) is crop with a great agronomic interest in Spain and specifically in the Region of Murcia due to the culture area destined to its cultivation and the huge volume of exports made. Muskmelon has been introduced in breeding programs from which parental lines are required. Those parental lines can be obtained by Double Haploid technique, in which 100% homozygous lines are obtained. However, parental muskmelon lines are hard to obtain by Double Haploid technique due to low induction of haploid plants and low efficiency in chromosome doubling. The aim of this work is to review the Double Haploid technique and the steps involved, and to perform an experimental trial in order to evaluate two antimetabolic compounds (colchicine and amiprofos-methyl) at different concentrations and exposure time. The results showed that effectiveness depends strongly on genotype. The most effective treatment was "control" treatment, colchicine 0.5 mM for 44 hours. This treatment had the best sprouting rate, and higher concentrations and exposure times had lower rates. Therefore, the conditions tested have not been enough to optimize the chromosomal duplication process, and it will be necessary, to test new experimental trial with more sample size for each treatment without compromising sprouting and regeneration.

Keywords: amiprofos-methyl, colchicine, double haploid lines, muskmelon.

1. Introducción

1.1. El melón: importancia agronómica y mejora genética clásica

El melón (*Cucumis melo* L.) es una planta herbácea englobada dentro de la familia de las cucurbitáceas junto a vegetales como el pepino (*Cucumis sativus* L.), la calabaza (*Cucurbita maxima*) o la sandía (*Citrillus lanatus* L.). Se trata de una especie anual y monoica que es cultivada principalmente en verano en zonas con climas cálidos. Morfológicamente, presenta tallos pilosos que crecen a ras del suelo, hojas palmadas, y frutos con alto contenido en agua y en sacarosa en estado maduro (Burger *et al.*, 2010). Es por ello que el melón tiene un gran interés agronómico mundial, siendo cultivado principalmente en China con 359.000 hectáreas, seguida de Irán con 85.000 hectáreas y Turquía con 78.000 hectáreas. España por su parte es el 12º productor mundial (19.000 hectáreas), y el segundo productor en Europa por debajo de Italia (FAOSTAT, 2018). Además, España es el principal exportador de melón del mundo (UN Comtrade, 2018).

El fruto del melón, además de su consumo directo, tiene también otros usos en la industria alimentaria, como la fabricación de siropes, golosinas o helados, y en la industria de la cosmética (Pitrat, 2008). Dentro de las variedades comerciales de melón, en España se cultivan principalmente los melones tipo “Amarillo”, y melones verdes como “Piel de Sapo” o “Tendral”, aunque en los últimos años se han introducido otras variedades como el melón tipo “Galia” o el Melón “Cantalupo” cultivados para su exportación a países como Inglaterra o Francia (Reche, 2008). (Figura 1).



Figura 1- Algunas de las principales variedades comerciales de melón en España. Imágenes obtenidas respectivamente en: frutaselmoje.es, verdify.es, efectofruta.com, teidefruits.com.

Debido a su gran importancia agronómica, el melón se ha introducido en muchos programas de mejora genética los cuales se centran en mejorar la calidad del fruto (firmeza, color, contenido de azúcares, o aroma), o en la introducción de genes de resistencia contra hongos, como *Podosphaera xanthii* y *Golovinomyces cichoracearum*, responsables de la enfermedad del oídio o blanquilla,

Pseudoperonospora cubensis responsable del mildiú, o *Fusarium oxysporum*, responsable de la Fusariosis, y virus como el virus del mosaico del pepino (CMV), el virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV), el virus del mosaico verde moteado del pepino (CGMMV) o el virus de la mancha necrótica del melón (MNSV) (Thakur *et al.*, 2019).

Estos programas de mejora se pueden abordar a través de la **mejora genética clásica**, cruzando variedades silvestres que presentan caracteres de interés con variedades parentales puras. El proceso se inicia con la generación de una población F1 que se vuelve a cruzar con la variedad parental, y así, después sucesivas generaciones de retrocruzamiento, se consigue introducir el carácter de interés en la variedad parental, y a partir de esta luego se pueden generar los híbridos comerciales. Sin embargo, este proceso dura de 7 a 9 años, y no se consiguen líneas 100% homocigóticas (Fritsche-Neto, *et al.*, 2014). Además, en el caso del melón la variabilidad natural de la población silvestre es bastante reducida, y existen problemas de incompatibilidad interespecífica (Nuñez-Paleniús *et al.*, 2008). Por ello, es muy interesante abordar la mejora genética del melón mediante otro tipo de estrategias biotecnológicas como la aplicación de técnicas de cultivo “*in vitro*” y la generación de **líneas dobles haploides (DHs)**.

1.2. Mejora biotecnológica: el cultivo “*in vitro*”

El cultivo “*in vitro*” consiste en la multiplicación de plantas o partes de estas de forma asexual, en condiciones de asepsia y bajo unas condiciones fisicoquímicas controladas. En general, el cultivo “*in vitro*” necesita menos espacio, permite generar plantas en menores tiempos que el cultivo tradicional, puede ser una fuente de variación genética gracias a la variación somaclonal, y permite sobrepasar las incompatibilidades reproductivas. Estas técnicas, no solo se pueden utilizar en los programas de mejora, sino que también se utilizan para el saneamiento de plantas infectadas por virus, así como para conservación de germoplasma (Pasqual *et al.*, 2014). El cultivo “*in vitro*” de tejidos vegetales comienza a partir de una parte de la planta llamada **explante**, que pueden ser órganos como hojas, raíces, o tejidos más específicos como meristemos, yemas o tejidos reproductores. Estos explantes, se multiplican de forma asexual y dan lugar a nuevas plantas en un proceso que se conoce como micropropagación. Hay que tener en cuenta que el crecimiento “*in vitro*” va a depender del tipo de material vegetal usado como explante, y también va a depender de otros factores como la edad y el tamaño del explante, la planta madre, y el genotipo (Smith, 2013a).

En mejora genética se pueden plantear dos objetivos, bien la **generación de variabilidad genética** o su mantenimiento, es decir la **obtención de clones** de la planta madre. Para ello, se pueden regenerar plantas completas, bien a partir de embriogénesis somática, o mediante organogénesis. Para la multiplicación clonal, se utilizan como explantes las yemas laterales, presentes en los segmentos nodales, y/o apicales. Con el uso de estos explantes se consigue una mayor estabilidad genética, una alta tasa de multiplicación y se evita la variación somaclonal, (Smith, 2013a). En cuanto a factores importantes del cultivo "*in vitro*" se encuentran los componentes del **medio de cultivo**, que van a depender de la especie vegetal objeto de estudio y la finalidad de la micropropagación. Mención especial tienen los **reguladores de crecimiento (PGRs, por sus siglas en inglés "plant growth regulators)**, como auxinas y citoquininas, los cuales van a controlar el desarrollo y crecimiento de la planta "*in vitro*". Así, dependiendo del tipo y concentración de PGRs utilizados podremos dirigir el crecimiento del vegetal (Smith, 2013c).

Una de las aplicaciones del cultivo "*in vitro*" dentro de la mejora genética, es el desarrollo de **plantas haploides**. Las plantas haploides presentan un único juego de cromosomas en sus células (n), y por lo tanto no tienen problemas de dominancia genética, lo que las hace idóneas para el estudio de caracteres recesivos de interés. Sin embargo, por sí solas, no tienen interés agronómico ya que generalmente, tienen poco vigor, son más sensibles a estreses bióticos y abióticos respecto a las plantas diploides y generalmente, son estériles. Sin embargo, si sometemos a las plantas haploides a un proceso de duplicación cromosómica, se puede obtener, en un periodo relativamente corto de tiempo, **líneas dobles haploides** ($2n$), las cuales son 100% homocigóticas, lo que acelera el obtención de líneas homocigóticas respecto a la mejora genética tradicional (Smith, 2013b). Gracias a esta técnica, se consigue la fijación de caracteres recesivos de interés y las líneas generadas pueden ser introducidas como parentales en programas de mejora.

Así por ejemplo, se han utilizado líneas dobles haploides dentro de los procesos de mejora y obtención de 290 variedades de muchas especies de interés agronómico como cereales (trigo, cebada, triticale), maíz, especies de brasicáceas, solanáceas como la patata, o cucurbitáceas como el pepino, la sandía o el melón (COST Action 851, 2006). Las líneas dobles haploides también pueden utilizarse para la elaboración de mapas genéticos o para transformación genética (Corral-Martínez, 2013).

1.3. Mejora biotecnológica en melón

En el caso del melón, se han utilizado las técnicas de cultivo “*in vitro*” para diversos fines, como la transformación genética mediada por *Agrobacterium* (Zhang *et al.*, 2014), y la regeneración “*in vitro*” de plantas completas mediante organogénesis (Liborio-Stipp *et al.*, 2001; Mendi *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013). Otro avance biotecnológico importante en melón fue la **publicación de su genoma** en el año 2012 (García-Mas *et al.*, 2012), lo que ha facilitado entre otras cosas la elaboración de mapas genéticos (Li *et al.*, 2020), así como el mapeo de locus de caracteres cuantitativos o QTL (Quantitative Trait Locus, por sus siglas en inglés) de interés como los relacionados con la acidez (Shang *et al.*, 2020), calidad del pericarpo (Zhang *et al.*, 2020), o la tolerancia a sulfuros (Branham *et al.*, 2020), entre otros.

En relación con la generación de **dobles haploides**, la técnica se ha introducido en los programas de mejora de cucurbitáceas para la obtención de líneas parentales, para la posterior formación de híbridos comerciales (Gonzalo *et al.*, 2011). Sin embargo, la aplicación de esta técnica ha sido limitada debido al bajo porcentaje de inducción de embriones haploides y la baja tasa de germinación y supervivencia de estos embriones. A estos problemas, se suma la dificultad para la generación de plantas dobles haploides, debido a la baja capacidad de duplicación cromosómica espontánea, y a la baja eficiencia en la inducción de dobles haploides usando agentes antimitóticos, generando en la mayoría de los casos haploides o mixoploides (plantas con diferentes proporciones de células $n/2n$) (Hooghvorst *et al.*, 2020).

En el caso del melón, respecto a la generación de haploides, fueron Sauton y Dumax-Vaulx los primeros que consiguieron generar haploides en melón mediante partenogénesis con polen irradiado (Sauton & Dumas-Vaulx, 1987). Sin embargo, aunque se han realizado estudios encaminados a mejorar la eficiencia en la producción de haploides y posteriormente dobles haploides (Lotfi *et al.*, 2003; Claveria *et al.*, 2005; Gonzalo *et al.*, 2011; Hooghvorst *et al.*, 2020), no se ha conseguido una alta eficiencia ni en la producción de haploides, ni en la generación de dobles haploides mediante duplicación cromosómica con antimitóticos. Por tanto, la optimización de los protocolos para la generación de plantas dobles haploides en melón continúa siendo un proceso necesario.

Frente a este desafío se encuentra trabajando la empresa de base biotecnológica **Abiopep S.L** (<https://www.abiopep.com>), en la que se desarrollo esté TFM. Abiopep S.L. lidera un proyecto multidisciplinar RIS3Mur (Consejería de Empleo, Investigación y Universidades) con el título “Herramientas tradicionales y biotecnológicas para crear nuevas variedades de melón con características de alto valor añadido adaptadas al cultivo y los mercados murcianos”. Entre los objetivos de este proyecto, se encuentra la puesta a punto de un protocolo eficiente para la generación de dobles haploides en melón, de forma que se puedan conseguir líneas parentales homocigotas para programas de mejora a partir de técnicas biotecnológicas. Dentro de este objetivo se encuentra enfocada la parte experimental de este trabajo.

2. Objetivos e hipótesis

Por todo ello, el principal objetivo de este trabajo es estudiar y comprender la técnica de generación de líneas dobles haploides, y aplicarla para la optimización del protocolo de regeneración de dobles haploides en melón. Se busca confirmar dos hipótesis: por un lado, que un mejor ajuste de la concentración y tiempo de incubación del agente antimitótico permitirá mejorar la eficacia del protocolo de duplicación cromosómica seguido por la empresa Abiopep S.L. hasta este momento, y por otro que la utilización de otro agente antimitótico menos tóxico que la colchicina podría sustituir a esta si consigue al menos la misma eficacia en melón. Para ello se planteó un trabajo de investigación mixto dividido en dos partes diferenciadas:

1. **Revisión bibliográfica** del estado del arte sobre la técnica de generación de dobles haploides en especies interés agronómico, y especialmente en melón.
2. **Ensayo experimental** para la optimización del protocolo de duplicación cromosómica en plantas haploides de melón y para la evaluación de un agente antimitótico amiprofos-metil (APM) alternativo a la colchicina.

2.1. Revisión bibliográfica

Se revisaron las principales etapas involucradas en la generación de plantas dobles haploides:

- Generación de plantas haploides: Principales técnicas de obtención: androgénesis, ginogénesis, partenogénesis, y líneas Inductoras de haploides, mencionando los factores que influyen en el éxito de cada técnica, y ejemplos prácticos de especies en las que se utiliza en cada caso. Se analizaron casos de aplicación de estas técnicas dentro de los principales cultivares de interés agronómico (cereales, solanáceas, brasicáceas, frutales etc.).
- Duplicación cromosómica de las plantas haploides. Los principales agentes químicos utilizados para la duplicación cromosómica de plantas haploides, mencionando sus usos en cada especie, y su eficacia, mostrando ejemplos prácticos de cada agente utilizado, comparando su efectividad.
- Análisis de los principales métodos para determinar ploidía, así como algunas aplicaciones de la técnica, y principales ventajas y desventajas de la técnica respecto a la mejora tradicional.

2.2. Ensayo experimental

Esta parte se presenta en formato de publicación científica. Tras una breve explicación sobre la metodología del trabajo, se expusieron y discutieron los resultados del ensayo experimental para **optimizar el proceso de duplicación cromosómica** en plantas haploides de melón (*Cucumis melo* L.). En este ensayo se utilizaron segmentos nodales de tres variedades comerciales diferentes de melón (“Piel de Sapo”, “Amarillo” y “Galia”) y compararon dos agentes antimitóticos (colchicina y AMP) a tres concentraciones diferentes y dos tiempos de incubación (44 y 140 h), evaluando su efecto en la brotación de nuevas yemas, regeneración de nuevas plantas a partir de ellas, y su éxito en la duplicación cromosómica.

3. Revisión bibliográfica: dobles haploides en la mejora genética vegetal

3.1. Metodología

Se utilizó la base de datos **Scopus** (<https://www.scopus.com/home.uri>) para buscar los principales artículos y revisiones bibliográficas sobre el estado del arte actual en cuanto a las técnicas para la obtención líneas dobles haploides. Los artículos científicos fueron clasificados y ordenados mediante el gestor bibliográfico **Mendeley Desktop** (versión 1.19.4 © 2008-2020 Mendeley Ltd.). Se seleccionaron las principales revisiones sobre el campo de dobles haploides, así como artículos científicos de los últimos años, con el fin de conocer las aproximaciones experimentales más recientes, y obtener una visión de la problemática actual.

3.2. Introducción: inicios de la técnica de generación de dobles haploides

La técnica de generación de dobles haploides se originó en el año 1922, cuando se describió por primera vez la aparición de haploides de forma natural en estramonio (*Datura stramonium*) (Blakeslee *et al.*, 1922). Sin embargo, los primeros protocolos de generación de plantas haploides en laboratorio no aparecieron hasta los años 60, cuando se obtuvieron por primera vez plantas haploides de esta misma planta mediante cultivo “*in vitro*” de anteras (Guha & Maheshwari, 1964). Por otra parte, la primera evidencia de duplicación cromosómica, se estableció en 1937, cuando se obtuvieron plantas tetraploides (4n) de estramonio tras la aplicación de colchicina (Blakeslee & Avery, 1937). Desde entonces, esta técnica se ha incorporado en muchos programas de mejora genética, con lo que se ha conseguido acelerar notablemente los programas de mejora de especies como cebada, trigo, tabaco o pimiento (Forster *et al.*, 2007).

El proceso de mejora genética mediante líneas dobles haploides se inicia con la selección de los parentales, de los que se selecciona el explante que se cultiva “*in vitro*” para la inducción de haploides. Una vez generadas las plantas haploides, éstas se someten a un proceso de duplicación cromosómica, para generar las plantas dobles haploides. Sin embargo, es necesario comprobar, en primer lugar, el nivel de ploidía de las plantas obtenidas, con el fin de determinar si éstas son haploides (n), diploides (2n), o mixoploides, es decir, si tienen células haploides y diploides mezcladas en distintas proporciones tanto n como 2n, puesto que estas técnicas no son efectivas al 100% (Fritsche-Neto, *et al.*, 2014).

3.3. Métodos de obtención de plantas haploides

Para la generación y establecimiento de plantas haploides se utilizan explantes procedentes de los órganos sexuales de plantas. En estos órganos se encuentran los gametos, células haploides debido a la meiosis, que se pueden cultivar “*in vitro*” empleando condiciones adecuadas (optimización de la composición del medio de cultivo, PGRs, condiciones de cultivo, etc.) y regenerar plantas completas haploides. En este aspecto, hay que destacar que se han desarrollado diversas técnicas en función del gametofito seleccionado. Así, a partir del gametofito masculino (**androgénesis**), existen protocolos centrados en el cultivo de anteras o de microsporas aisladas, y a partir del gametofito femenino (**ginogénesis**) se han desarrollado protocolos para el cultivo de óvulos, ovarios o bulbos florares (Murovec & Bohanec, 2012).

Los métodos “*in vitro*” son dependientes de factores como el genotipo de los parentales y su estado fisiológico, el estado de desarrollo de los gametos, los pretratamientos realizados, la composición del medio de cultivo, y los factores físicos durante el crecimiento “*in vitro*”, como la luz, el fotoperíodo o la temperatura. Todo ello va a condicionar mucho la efectividad de estos métodos (Watts *et al.*, 2018). Actualmente existen protocolos para la obtención más de 200 especies de plantas diferentes usando estos métodos “*in vitro*” (Dunwell, 2010).

Por otro lado, existen otro tipo de técnicas “*in vivo*” como la **partenogénesis**, que también utilizan el gametofito femenino como fuente de material. Sin embargo, a diferencia de las técnicas de ginogénesis, no se cultivan los gametofitos “*in vitro*”, sino que se induce la formación de un fruto partenogénico. Para ello se realiza una polinización controlada de las flores en la que se utiliza bien polen de la misma especie que se inactiva, o bien polen de otra especie. Tras esta polinización, se produce el desarrollo endospermo, pero no se puede realizar la fusión de gametos y el genoma de un parental se degrada, por lo que se continúa el desarrollo del fruto, pero con embriones que solo tienen la dotación cromosómica del gametofito femenino y por lo tanto son haploides (Murovec & Bohanec, 2012).

En muchos casos, durante el desarrollo de los frutos partenogénicos, los embriones haploides abortan de forma espontánea, y antes de que este proceso ocurra, es necesario rescatar y cultivar los embriones “*in vitro*” (Watts *et al.*, 2018).

Más recientemente, se han conseguido obtener **líneas inductoras de haploides**, mediante la mutación y selección de variedades con genes específicos, como mutaciones en la histona CENH3, o en el caso del maíz las líneas inductoras haploides *ig1*, o Stock6 (Kalinowska *et al.*, 2019).

a. Métodos “in vitro”. Androgénesis

La androgénesis, como se ha dicho anteriormente, se basa en el cultivo “*in vitro*” de anteras y/o microsporas. Estas, pueden ser reprogramadas desde su estado de desarrollo normal hacia un estado embriogénico mediante la aplicación de diferentes tipos de estrés (estrés por calor/frío, medios con bajo contenido en carbono, pretratamiento con colchicina, Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), entre otros) y posteriormente, bajo unas condiciones adecuadas de cultivo “*in vitro*”, son capaces de regenerar en una planta completa haploide (Fritsche-Neto, *et al.*, 2014).

La androgénesis, es la una de las técnicas más utilizada para la generación de plantas haploides, ya que, a diferencia de otros métodos, se han reportado en muchas especies, casos **duplicación cromosómica espontánea** en estados tempranos del desarrollo embrionario, obteniéndose en un solo paso plantas dobles haploides. Sin embargo, la técnica presenta algunas limitaciones, ya que es recalcitrante en algunas especies, y se han descrito problemas de albinismo (Ahmadi & Ebrahimzadeh, 2020).

La regeneración de una planta completa se puede conseguir de dos formas: mediante embriogénesis directa, donde las microsporas se transforman en embrioides a partir de los cuales se genera una planta completa, y mediante organogénesis indirecta, donde a partir de las microsporas se forman callos con células indiferenciadas, y a partir de estos se desarrollan los órganos de la planta formando en primer lugar la parte aérea de la planta, y a continuación las raíces (Fritsche-Neto, *et al.*, 2014).

Los factores que influyen en la técnica son, el genotipo de la planta madre, las condiciones de cultivo, los reguladores del crecimiento utilizados. Además, existen dos factores críticos que son, por un lado, **el estado de desarrollo del polen** ya que, dependiendo de estado de desarrollo, tendrán una mayor capacidad embriogénica. El estado uninucleado del polen es el que tiene más capacidad embriogénica, y en un estado de desarrollo más avanzados son incapaces, en algunos casos, de revertir el estado embriogénico (Smith, 2013b). Así por ejemplo en kiwi (*Actinia deliciosa*), se observó en dos variedades diferentes que el estado de desarrollo de las microsporas uninucleado tardío era en el que mayor ratio de inducción de callos se obtenía (80%),

mientras que estados de desarrollo más avanzados, el ratio era menor (Wang *et al.*, 2018).

Por otro lado, otro factor importante en la técnica es el tipo de **pretratamiento aplicado y su duración** (Smith, 2013b). En cereales, existen estudios que han puesto de manifiesto la importancia de la aplicación de pretratamientos previos al cultivo “*in vitro*” de anteras. En cebada (*Hordeum vulgare*), se consiguió aumentar considerablemente la regeneración de plantas haploides (de un 23.4% a un 100%) sometiendo a las anteras a un pretratamiento de 4°C durante 28 días, respecto a un control a 4°C durante 5 días (Bilynska, 2020). En otras especies como avena (*Avena sativa* L.), en dos variedades preseleccionadas por su alta tasa de generación de embrioides, se consiguió aumentar en un 1.7% la tasa de generación respecto a un control, tras aplicar un tratamiento de 4°C durante 2 semanas seguido de 24 horas a 32°C. (Warchoń *et al.*, 2019). En centeno (*Secale cereale*), un pretratamiento con manitol (0,7 mmol/L) y glutatión reducido (0,3 mmol/L) consiguió aumentar la respuesta androgénica aumentando el número de divisiones tanto para cultivo de anteras como cultivo de microsporas (Zieliński *et al.*, 2020).

La **fuerza del explante** (anteras y/o microsporas aisladas), también va a influir en el proceso. Si se cultivan microsporas aisladas se requiere menos tiempo y trabajo, y se permite un correcto reparto de componentes del medio de cultivo en las microsporas, con un desarrollo más sincrónico. Sin embargo, por contrapartida existen algunos factores necesarios para el desarrollo de las microsporas, que aporta la antera, que es necesario añadir al medio (Niazian & Shariatpanahi, 2020). En microsporas aisladas, se ha puesto de manifiesto la importancia de incorporar en los medios de cultivo surfactantes, como en *Brassica campestris*, ya que al añadir al Tritón X-100, Pluronic F-68 o Tween-20 a concentraciones de 0.0001%, en los medios de cultivo, se incrementó considerablemente la frecuencia de embriogénesis, consiguiendo porcentajes de duplicación cromosómica espontánea del 77% (Gao *et al.*, 2019).

En algunos cultivares, la investigación actual se basa en la optimización de protocolos, modificando la **composición de los medios de cultivo “in vitro”**. Por ejemplo en arroz (*Oryza sativa*), Dewi y colaboradores, ensayaron diferentes medios para la regeneración de callos a partir del cultivo de anteras, modificando la concentración de sacarosa, de forma que con un 6.5% de sacarosa, se consiguió una mayor inducción (11%) y una regeneración (25%) de plantas verdes completamente funcionales (Dewi *et al.*, 2020). En otro ensayo con arroz negro se modificaron los

reguladores del crecimiento para la inducción de callos y regeneración de plantas, consiguiendo hasta un 13.33% de inducción de callos con una combinación de 2,4-D, y kinetina (Haring *et al.*, 2020). En berenjena (*Solanum melongena* L.), se observó un efecto sinérgico entre la maltosa, el AgNO₃ y el carbón activo, y medios que incluían ambos componentes consiguieron mejorar la viabilidad de las anteras, la embriogénesis directa, y la regeneración de las plantas, aunque se observó que este efecto era dependiente del genotipo (Vural & Ari, 2020). Finalmente, en plantas recalcitrantes a la androgénesis como el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) se ha conseguido obtener plantas haploides a partir de anteras utilizando en los medios de inducción 2,4-D y AgNO₃ (Abdollahi & Rashidi, 2018).

b. Métodos “in vitro”. Ginogénesis

La ginogénesis engloba todo el conjunto de técnicas de generación de plantas haploides a partir del gametofito femenino (cultivo de óvulos, ovarios o bulbos florares) a partir de los cuales, se pueden desarrollar plantas haploides completas. Esta técnica es una alternativa a la androgénesis, especialmente utilizada en especies donde ésta es recalcitrante, en especies o variedades concretas donde existen problemas de albinismos, o en plantas donde existen problemas de esterilidad masculina (Chen *et al.*, 2011).

Esta técnica presenta algunas diferencias importantes respecto a la androgénesis, siendo la más importante la **independencia del estado de desarrollo de los óvulos**, ya que, a diferencia de la androgénesis, se puede conseguir respuesta embriogénica en muchos estados del desarrollo de estos órganos. Sin embargo, existe un bajo porcentaje de duplicación cromosómica espontánea de las plantas generadas a partir de esta técnica. Por otro lado, aunque las condiciones de cultivo “*in vitro*” no son tan específicas como en el de cultivo de anteras, es necesaria la presencia de reguladores del crecimiento en los medios de cultivo, y el genotipo de la planta madre influye notablemente en la eficacia del proceso (Bohanec, 2008).

Algunos trabajos han comparado ambas técnicas (androgénesis y ginogénesis) comparando su efectividad como en el caso de la zanahoria, donde se observó para la androgénesis un 7,2% de inducción de callos, frente a un 18% de inducción de callos a partir de los óvulos cultivados. Además, mientras que para el cultivo de anteras solo se consiguió inducir callos a partir de anteras que presentaron microsporas en el estado uninucleado, para el cultivo de óvulos, se encontraron en estado de desarrollo tardío del óvulo, pero también se encontraron en estado de desarrollo temprano y en estado 8-nucleado (Domblides, 2017).

La ginogénesis ha sido efectiva en especies como por ejemplo la cebolla (*Allium cepa* L.), ya que existen problemas de albinismo, genotipos recalcitrantes, y hay problemas para realizar androgénesis debido a la presencia de anteras y polen no funcionales, lo que hace que la obtención de haploides se tenga que abordar mediante el cultivo de óvulos u ovarios (Khan *et al.*, 2020).

En remolacha (*Beta vulgaris* L.), también se aplica estas técnicas debido a que es también recalcitrante a las técnicas de androgénesis. En este caso son también importantes pretratamientos por frío, o la presencia en el medio de cultivo de reguladores del crecimiento. Al aplicar un pretratamiento en frío, aumentó la inducción de embrioides en un 2.86% frente al control sin pretratamiento, mientras que la aplicación de kinetina el aumento en la inducción de embrioides fue de un 1.1% (Pazuki, *et al.*, 2018a) Se ha observado también un efecto sinérgico entre pretratamientos de frío, en este caso de 1 semana a 4°C junto a la presencia en el medio de BAP, consiguiéndose en este caso un porcentaje de inducción de embrioides del 37.8% (Pazuki, *et al.*, 2018b).

Finalmente, respecto a las cucurbitáceas, existen protocolos experimentales para la obtención de haploides mediante ginogénesis en: pepino (*Cucumis sativus* L.), calabaza (*Cucumis maxima* y *Cucurbita mostacha*), sandía (*Citrullus lanatus*) y melón (*Cucumis melo* L.), donde se ha estudiado la interacción entre el genotipo de las plantas madre, la aplicación de pretratamientos, y la presencia de reguladores hormonales en el medio. En calabaza y sandía por ejemplo, se observó que eran necesarios medios con ácido indolacético (AIA), ácido 1 naftalen acético (ANA), thidiazurón (TDZ), y 6-benzilaminopurina (BAP), para la inducción de haploides, aunque los ratios de inducción de embrioides fueron diferentes dependiendo de los genotipos (Kurtar, *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2018; Zou *et al.*, 2020). En pepino, además de los reguladores y el genotipo, se ha visto una interacción positiva de pretratamientos con frío, y la presencia de TDZ en los medio de inducción (Deng *et al.*, 2020). Aunque en otro estudio, no se observaron diferencias entre genotipos respecto a la inducción de embrioides (Sorntip *et al.*, 2017). Finalmente en melón, son necesarios medios con 2,4-D, así como pretramientos de temperatura, aunque la respuesta también depende de los genotipos (Kaur *et al.*, 2019).

c. Métodos “in vivo”. Partenogénesis

La **partenogénesis** abarca todo el conjunto de técnicas en las cuales se induce el desarrollo de embriones haploides sin fecundación, a partir de los cuales se desarrolla una planta completa. La inducción de embriones haploides se puede conseguir de diferentes formas: por un lado, mediante el uso de **radicación ionizante**, de forma que se utilizan altas dosis de radiación sobre el polen y éste se utiliza para fecundar una planta previamente emasculada (*Germanà, 2011*). Otra aproximación para inducir partenogénesis consiste en la fecundación de una planta madre con polen de especies diferentes (**hibridación interespecífica**). En este caso debido a la incompatibilidad de los genomas, aunque se produce la fecundación, se produce la eliminación selectiva de uno de los dos genomas, lo cual desencadena el desarrollo de un embrión haploide (*Watts et al., 2018*). Otras estrategias se enfocan en el cruzamiento de individuos emparentados genéticamente, pero con diferentes niveles de ploidía (**hibridación intraespecífica**). Un ejemplo claro de esta técnica está en la patata (*Solanum tuberosus* tetraploide 4n), donde se han obtenido haploides con el cruzamiento de esta especie, con especies diploides (2n) como *Solanum phureja*, de forma que el óvulo no es fertilizado, y se desarrolla gracias al endospermo triploide (*Watts et al., 2018*).

Como ya se ha comentado, los embriones en muchos casos no llegan a desarrollarse y abortan en estados tempranos del desarrollo embrionario, por lo que hay que rescatarlos y cultivarlos “*in vitro*” antes de que ocurra este proceso, siendo un factor importante en la técnica, cuanto tiempo se tarda en realizar el rescate “*in vitro*” después de la polinización (*Germanà, 2011*).

- Partenogénesis mediante polen irradiado

La aplicación de altas dosis de radiación hace que el polen germine en el estigma, pero no sea capaz de fecundar al ovulo ni al núcleo polar, aunque si es capaz de inducir la división del ovulo, induciendo la partenogénesis. Esta técnica está influenciada por factores como el estado de desarrollo del óvulo, las condiciones de cultivo, y la **dosis de radicación aplicada**. Esta última depende a su vez del genotipo, aunque normalmente se utilizan altas dosis de radiación, ya que bajas dosis permiten la fecundación del ovulo y la hibridación con el genoma del parental masculino (*Germanà, 2011*).

La partenogénesis mediante polen irradiado se está introduciendo en la mejora genética de **cítricos**, aunque existen aproximaciones mediante cultivo de anteras, por ejemplo para la naranja (*Citrus x sinensis*) (Iacuzzi *et al.*, 2019). Sin embargo, los haploides producidos a partir de androgénesis en cítricos son débiles y crecen muy lentamente (Germanà, 1997). En especies como el pomelo (*Citrus x paradisi*), la androgénesis es recalcitrante, por lo que hay aproximaciones experimentales para optimizar la obtención de haploides mediante partenogénesis. Wang y colaboradores, estudiaron diferentes dosis de radiación gamma (255-500 Gy) en cruces de pomelo con polen de dos variedades de naranja, para comprobar el comportamiento y estabilidad del polen durante la fecundación. Aunque la viabilidad del polen era muy diferente entre variedades (de un 95% a un 25% de viabilidad), no se observaron diferencias en cuanto a las dosis aplicadas respecto a los respectivos controles (Wang *et al.*, 2016).

Otro estudio realizado con naranja (*Citrus x sinensis*), lima (*Citrus x limetta*) y pomelo, se ensayaron dosis de 50 a 400 Gy, y diferentes tiempos de rescate “*in vitro*” después de la polinización (20, 35 y 50 días después de la polinización) de forma que la regeneración de plantas completas fue inferior en las dosis superiores y aquellas dosis de radiación por debajo de 300 Gy no eran capaces de inducir plantas haploides. (Kundu *et al.*, 2017). En níspero (*Eriobotrya japonica*), se ensayaron dosis de 150 a 300 Gy y tiempos de rescate de 90, 105 y 120 días después de la polinización. Sin embargo, sólo se obtuvieron plantas haploides con dosis de 150 Gy y con 105 días después de la polinización (Blasco *et al.*, 2016).

Mención especial tienen en esta técnica las **cucurbitáceas**, siendo esta la principal fuente de obtención de plantas haploides. En el caso del melón, la partenogénesis mediante polen irradiado ha sido la técnica más eficaz para generar plantas haploides, respecto a otras cucurbitáceas. La eficacia del proceso también se encuentra afectada por el genotipo de la planta madre, las dosis de radiación y las condiciones de cultivo “*in vitro*” (Dal *et al.*, 2016). Normalmente, se usan dosis de radiación que van desde 250 a 500 Gy (Lotfi *et al.*, 2003; Gonzalo *et al.*, 2011; Hooghvorst *et al.*, 2020). Dependiendo del genotipo, se han visto diferencias respecto al número de embriones partenogénicos por ejemplo, a partir de un mismo número de flores, de una variedad amarilla, se consiguieron los peores resultados, generando únicamente 3 frutos, a partir de los cuales se desarrollaron 2 embriones haploides, mientras que de otra variedad piel de sapo, se generaron 99 frutos, de los cuales se consiguieron generar 219 embriones haploides (Gonzalo *et al.*, 2011).

Como ya se ha comentado, en melón existen bajas tasas de germinación y supervivencia de los embriones partenogénicos. Por ejemplo, otro estudio realizado sobre la variedad “Piel de Sapo”, se polinizaron 1128 flores, de las cuales, solo 178 desarrollaron fruto, obteniéndose 53 embriones partenogénicos. De estos 53, al final sólo 26 regeneraron en plantas completas. Y finalmente, al realizar las medidas de ploidía se obtuvieron únicamente 19 plantas haploides (Hooghvorst *et al.*, 2020).

- Partenogénesis mediante hibridación interespecífica

Esta aproximación se ha abordado principalmente en cereales, aunque se ha reportado éxito con otras muchas especies (Ishii *et al.*, 2016). Por ejemplo, se ha conseguido obtener embriones haploides en trigo, mediante su cruce con otras especies de cereal como cebada (*Hordeum vulgare*) o maíz (*Zea mays*). En un cruce con polen de *Imperata cylindrica*, se obtuvo una inducción de 32% de embriones haploides (Rather *et al.*, 2017).

En centeno se ha abordado también la hibridación interespecífica, mediante el cruce con polen de maíz, y se ha observado que la formación de haploides está fuertemente condicionada por el genotipo de la planta madre, de forma que, de 15 genotipos ensayados, solo se consiguió generar plantas haploides en 6 de los genotipos (Marcinińska *et al.*, 2018).

d. Métodos “in vivo”. Líneas inductoras haploides

Dentro de esta técnica, tienen gran utilidad las líneas inductoras originadas a partir de CENH3. CENH3 es una proteína de la familia de las histona H3, cuya función es determinar la posición del centrómero durante la segregación de cromosomas en la meiosis. Por lo tanto, mutaciones en el gen *CENH3* dan lugar a proteínas CENH3 alteradas que no puede realizar su función correctamente, por lo que se originan fallos durante el proceso de segregación cromosómica. El cruzamiento de líneas mutadas *cenh3* con líneas normales (WT), originan embriones haploides a partir de los cuales se pueden desarrollar plantas haploides (Britt & Kuppu, 2016). A excepción de algunos insectos, la función de esta proteína está muy conservada en la mayoría de organismos, por lo que se ha utilizado en muchas especies vegetales como cucurbitáceas, solanáceas (tomate), umbelíferas (zanahoria) o asteráceas (achicoria) (Niazian & Shariatpanahi, 2020).

Para conseguir la edición del inactivación que codifica para CENH3, se han seguido varias estrategias, como el silenciamiento de este gen, mediante la técnica de CRISPR-Cas. Esta aproximación se ha utilizado en maíz, de forma que se comprobó al cruzar variedades silvestres con variedades editadas, que se eliminaba el genoma de un parental (Kelliher *et al.*, 2019) y también se ha empleado esta estrategia para inducir mutaciones en el gen *CENH3* en zanahoria, aunque no se ha establecido, por el momento, un protocolo para la inducción de plantas haploides (Dunemann, *et al.*, 2019).

Existen también patentes en las que se han conseguido generar eficientemente líneas inductoras haploides a través de la mutación de CENH3 en **cucurbitáceas** (Patente WO 2017/081011 A1, (Lelivelt *et al.*, 2017)) y también se ha registrado una patente para la modificación de una secuencia conservada del gen *CENH3* (WO 2017/200386 A1 (Gallard *et al.*, 2017)).

3.4. Duplicación cromosómica de las plantas haploides

Algunas de las aproximaciones vistas anteriormente, como la androgénesis, existen casos de duplicación cromosómica espontánea de las plantas haploides generadas. Sin embargo, en aquellos casos en los que no se produce la duplicación espontánea, es necesario realizar un proceso de **duplicación cromosómica**. Este proceso se realiza, utilizando explantes que se someten a un proceso de regeneración “*in vitro*” en presencia de agentes antimitóticos. Estos agentes antimitóticos se incluyen en medios de inducción, sólidos o líquidos, y en el proceso de regeneración, se obtienen plantas completas que han duplicado sus cromosomas respecto al explante original (Ahmadi & Ebrahimzadeh, 2020).

La eficacia de la duplicación cromosómica está condicionada por el agente antimitótico utilizado, y también depende de factores como la concentración, ya que concentraciones muy bajas no tiene efecto de duplicación cromosómica o pueden producir mixoploidías y concentraciones muy elevadas pueden provocar la muerte del explante u otro tipo de ploidías múltiples, el tiempo de incubación de los explantes en el agente antimitótico, todos ellos influenciados por la especie y el genotipo en el que se emplea el agente antimitótico. Hay que tener también en cuenta, la fente de explante utilizada para la duplicación cromosómica, ya que, por ejemplo, la utilización de embrioides evita la formación de quimeras, pero puede originar una mayor variación somaclonal. En cuanto a segmentos nodales, éstos también permiten la regeneración de plantas completas a partir de las yemas axilares, pero es necesario

que estos agentes antimitóticos lleguen a todas las células totipotentes para que el proceso será eficaz y para evitar la formación de mixoploidías (Touchell *et al.*, 2020).

Los agente antimitóticos usados principalmente son los siguientes:

- Colchicina

La colchicina es la sustancia más utilizada para duplicación cromosómica. Se extrae la planta *Colchicum autumnale* y tiene usos en medicina, debido a sus propiedades antiinflamatorias. Sus propiedades antimitóticas residen en su afinidad por la beta-tubulina, de forma que se une a ella e impide la polimerización de los microtúbulos durante la división celular de la meiosis, de forma que los cromosomas se duplican, pero no se produce la separación. En plantas se usa en rangos de concentración elevados de 0,125 mM – 12,5 mM, debido a que presenta mayor afinidad por los microtúbulos de vertebrados, respecto a los microtúbulos de plantas y requiere altas concentraciones para ser efectiva, lo que puede provocar problemas de toxicidad. Además, su efectividad está condicionada por la especie vegetal y el genotipo específico mostrando grandes diferencias entre variedades de una misma especie (Touchell *et al.*, 2020).

Dependiendo de la especie, las dosis y tiempos de incubación efectivos van a ser diferentes. Así, por ejemplo, en limón (*Citrus x limon*) la dosis efectiva de colchicina para la generación de tetraploides en semillas es de 0,625 mM durante 24 h. Con este tratamiento se consigue una tasa de duplicación superior al 35% y un porcentaje de supervivencia del 100% (Bhuvaneswari *et al.*, 2020).

Sin embargo, en trigo las dosis de colchicina efectivas en la inducción de diploides oscilan entre 12,5-17,5 mM (Mehta *et al.*, 2020). En bracicáceas, por su parte, se han utilizado concentraciones de 2.5 mM de colchicina para la generación de hexaploides, si bien la tasa de duplicación es inferior al 6% y con un 27% de formación de quimeras (Chen *et al.*, 2020). Finalmente, en tabaco, utilizando concentraciones elevadas de colchicina, 10 mM durante 48 h, a vástagos precedentes de plántulas haploides de distintas variedades consiguieron ratios de duplicación de hasta 22-10 % dependiendo de la variedad, y diferencias en la fitotoxicidad, con ratios de supervivencia que oscilan entre el 35-18% (Lu *et al.*, 2020).

- Herbicidas con actividad antimitótica

Existen algunos compuestos herbicidas, que presentan actividad antimitótica, y pueden ser utilizados en menores concentraciones que la colchicina debido a su mayor afinidad por estructuras vegetales, lo que hace que se estén empezando a plantear como alternativas a la colchicina. Dentro del grupo de las dinitroanilinas, se encuentran la **trifuralina** o la **orizalina**, las cuales tienen afinidad por la alfa-tubulina (< 500 nM) e impiden la polimerización de los microtúbulos. Sin embargo, éstas no tienen tanta solubilidad en agua como la colchicina (>1,5 M), mientras que la orizalina se satura en agua a una concentración < 7,5 µM (Touchell *et al.*, 2020). Así por ejemplo, se han utilizado concentraciones de orizalina de 5 µM durante 12 h en segmentos nodales de *Rosa rugosa*, con unas tasas de duplicación cromosómica del 35% (Allum, *et al.*, 2007).

Otro herbicida con actividad antimitótica utilizado es el amiprofos-metil (**APM**), el cual se une a la α -tubulina de la misma forma que la orizalina. El APM es más soluble en agua respecto a las dinitroanilinas, y es una alternativa menos tóxica que la colchicina ya que se puede utilizar a bajas concentraciones (Touchell *et al.*, 2020).

En la bibliografía se han realizado varios estudios en los que se compara la eficacia de la colchicina con los herbicidas antimitóticos mencionados. Por ejemplo, en arroz (variedad japónica), se ha comparado el uso de colchicina y orizalina a diferentes concentraciones (0.625-5 mM para la colchicina, y 3-14 µM para la orizalina) durante 5 horas, sobre plantas haploides generadas a partir del cultivo de anteras. En este caso, el tratamiento más eficaz en la inducción de diploides fue con 3 µM de orizalina con más de un 6% de inducción de plantas completamente diploides. Por el contrario, sólo con la dosis más baja de colchicina (0,625 mM) se consiguió inducir plantas completamente diploides, pero con una eficacia menor (2.13%) y con una menor tasa de supervivencia de los explantes tratados (Hooghvorst *et al.*, 2018).

En cuanto a frutales, en el caso de la manzana, se ha comparado la efectividad de la colchicina, orizalina, trifluralina y APM, para la regeneración de tetraploides a partir de segmentos nodales y hojas. En este experimento, la eficacia dependió de la fuente del explante utilizada, de forma que, para las plantas generadas a partir de hoja, el tratamiento con colchicina fue el más eficaz, con un índice de duplicación de 20,2%, mientras que con el resto de antimitóticos se obtuvieron índices de duplicación por debajo del 4%. Por el contrario, para las plantas generadas a partir de segmentos nodales, el tratamiento con APM fue el más eficaz con un 9,8% seguido del

tratamiento con orizalina con un 7,4% (Podwyszyńska *et al.*, 2017). De la misma forma, el tratamiento con APM fue el más efectivo para la duplicación cromosómica en plantas haploides de maíz con una tasa de duplicación del 45% en comparación con la orizalina y la colchicina, (Ren *et al.*, 2018). Por su parte en espinaca, se han conseguido tasas de duplicación cromosómica importantes tanto con colchicina, como con orizalina y trifluralina (Roughani *et al.*, 2017).

- Duplicación cromosómica en melón

En melón el agente antimitótico más usado es la colchicina, la cual se aplica a segmentos nodales “*in vitro*” (Hooghvorst *et al.*, 2020). La eficacia en melón también depende del genotipo, así como la concentración utilizada del antimitótico y el tiempo de aplicación. Así por ejemplo, en variedades rojas de melón como “Quincy”, “Rupia red” o “View red”, el tratamiento con colchicina a una concentración de 2,5 mM no fue suficiente para inducir la generación de plantas dobles haploides (Yashiro *et al.*, 2002). En otro estudio, en el que se ensayaron concentraciones de colchicina de 1,25 y 2,5 mM durante 3 horas, se consiguió un porcentaje de inducción de plantas dobles haploides superior al 10% de un total de 64 plantas que regeneraron, aunque el tratamiento con 2,5 mM de colchicina provocó una mayor mortalidad (Lim & Earle, 2008). En otras variedades como “Kirkagac” o “Yuva Hasanbey” se han utilizado concentraciones de 12,5 mM de colchicina durante dos horas, consiguiendo un 10% de plantas dobles haploides (Solmaz *et al.*, 2011).

3.5. Métodos para determinar el nivel de plodía

Como hemos comentado anteriormente las técnicas de generación de haploides y la duplicación cromosómica de plantas haploides no son totalmente efectivas, y es necesario comprobar el nivel de ploidía de las plantas generadas. Para este fin se emplean varias aproximaciones como la **caracterización morfológica**, el **contaje de cromosomas** en metafase y la **citometría de flujo**.

La **caracterización morfológica** consiste en la evaluación de determinadas estructuras y órganos en las plantas haploides obtenidas. En general las plantas haploides producen flores más pequeñas con malformaciones, en el bulbo o en el desarrollo de las anteras o el estigma respecto a sus respectivos diploides. Otra diferencia está en el número de estomas en las hojas, ya que, dependiendo de si la planta es haploide o diploide, el número va a ser diferente (Ahmadi & Ebrahimzadeh, 2020).

El **contaje de cromosomas** en metafase es mucho más preciso. Si el número de cromosomas de una especie es n , en plantas haploides será $n/2$. Los cromosomas se pueden ver directamente al microscopio mediante preparaciones histológicas de tejido vegetal. Para ello se suelen utilizar células de la cofia de la raíz, ya que son células en crecimiento, no diferenciadas y con un alto grado de condensación cromosómica. Para realizar estas preparaciones, el tejido vegetal se trata con agentes anti-microtubulares para evitar la segregación cromosómica, y se tiñe con colorantes que presentan afinidad por el DNA como la tinción de Feulgen o mediante DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Maluszynska, 2003).

Finalmente, la aproximación más utilizada y fiable, es mediante el **citómetro de flujo**, ya que gracias a esta técnica se puede establecer con precisión la presencia de mixoploidías y su proporción. Este método consiste en la preparación de suspensiones de núcleos celulares, los cuales se tratan con fluorocromos que se une específicamente al DNA, de forma que el citómetro irá midiendo en cada célula de la suspensión la intensidad emitida por el fluorocromo que será proporcional a la cantidad de DNA de ese núcleo. En este caso, son necesarios unas suspensiones nucleares control con células haploides y diploides para comparar el nivel de intensidad, con el de la muestra. Para obtener suspensiones de núcleos se puede utilizar tejidos del vegetal como hojas, las cuales se trituran con una cuchilla (Ahmadi & Ebrahimzadeh, 2020).

3.6. Aplicaciones, ventajas y desventajas de la técnica de DHs

Al final del proceso de generación de dobles haploides, se obtienen líneas 100% homocigóticas y estas pueden ser utilizadas como parentales en los programas de mejora genética. Entre las principales **ventajas** de la técnica de generación de dobles haploides, se encuentran los menores tiempos de generación de líneas homocigóticas respecto a las técnicas de mejora tradicional. Además, gracias al proceso de duplicación cromosómica se consigue aumentar la proporción de genotipos homocigóticos con los alelos recesivos, y se consigue una mejor explotación de la variabilidad genética, cancelando los efectos de dominancia y epistasis. Además, permite la identificación de mutantes y la eliminación de genes letales (Fritsche-Neto, *et al.*, 2014).

Por el contrario, este proceso presenta algunas **desventajas**, siendo la principal la baja eficacia del proceso, consiguiendo muy pocas líneas dobles haploides, lo que hace que en algunos casos sea difícil la incorporación de estas líneas en los programas de mejora genética. Otro de los problemas generado del proceso de

regeneración “*in vitro*” es que se puede producir sesgo en la selección, ya que durante el proceso se seleccionan inevitablemente genotipos con capacidad para desarrollarse “*in vitro*”, pudiendo perder en el proceso otros genotipos de interés (Fritsche-Neto, *et al.*, 2014).

Finalmente, en cuanto a **aplicaciones**, la aplicación más directa es la introducción en programas de mejora genética, tanto en especies con autopolinización, como en especies con polinización cruzada. En el primer caso, las líneas dobles haploides generadas tras una evaluación agronómica pueden ser utilizadas como cultivares. En el segundo caso, estas líneas pueden ser utilizadas como parentales o para aumentar la variabilidad genética en programas de selección recurrentes (Fritsche-Neto, *et al.*, 2014).

Otra de las principales aplicaciones estas líneas, es para el mapeo de QTL de interés, gracias a la generación de líneas recombinantes consanguíneas (Recombinant Inbred Lines, RILs). Estas son un tipo de poblaciones de mapeo en las que se cruza sucesivamente la generación F1 obtenida de los parentales, de forma que tras sucesivos autocruzamientos obtenemos en la F8 individuos con el genoma de los dos parentales mezclado, pero cada individuo tendrá una combinación diferente lo cual nos puede ayudar a identificar QTL. En este caso, las líneas dobles haploides, permiten acelerar los procesos de generación de estas líneas y reduce las posibilidades de realizar cruces no intencionados (Fritsche-Neto, *et al.*, 2014).

4. Ensayo Experimental: Optimización del protocolo de duplicación cromosómica

4.1. Metodología

a) Material vegetal y multiplicación de las líneas haploides

En este trabajo se han utilizado cuatro líneas haploides de melón preexistentes en la empresa Abiopep S.L. Las variedades empleadas fueron dos de tipo “Piel de Sapo”, una de tipo “Amarillo” y otra de tipo “Galia”. Por razones relacionadas con la propiedad intelectual, estas líneas se nombraron solamente con los siguientes siglas (M13-8, KR-3, Cd-1 y A2-2), sin dar detalles de variedades. En todo caso, todas las variedades proceden en origen del banco de germoplasma del IMIDA (Instituto Murciano de Desarrollo Agrario y Alimentario) (BAGERIM). Estas cuatro líneas haploides se multiplicaron mediante micropropagación. Para ello, se cortaron segmentos nodales de 1.5-2 cm de longitud descartando la parte basal y radicular, debido a su menor potencial de regeneración, así como el peciolo de las hojas, sin alterar las yemas laterales. A continuación, los segmentos nodales se cultivaron en medio M404 compuesto por sacarosa (3%), utilizada como fuente de carbono, ácido 2-(N-morfolino) etanolsulfónico (MES) [0,6 mg/ml], el cual es utilizado como agente tamponador del medio, CuSO₄·5H₂O [10 mg/ml] utilizado como antifúngico, medio basal Murashige & Skoog modificado (+ vitamina B5) [4,44 mg/ml] en el cual se incluyen los macronutrientes y micronutrientes necesarios para el crecimiento de la planta y agar (0,7%) en el caso de trabajar con medio sólido. Los explantes se mantuvieron a 26°C y bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz con una intensidad de 200 $\mu\text{M m}^2 \text{s}$ y 8 horas de oscuridad durante 4 semanas en un Fitotrón (EQUITEC. Ref. EGCS 701 3S HR).

b) Preparación de los compuestos antimetabólicos, medios inductores y explantes

Los medios inductores se prepararon dentro de una cabina de flujo laminar. La colchicina (Sigma-Aldrich Ref. C9754) y el APM (Sigma-Aldrich Ref.329747856) se disolvieron en dimetilsulfoxido (DMSO) a una concentración de 250 mM y 16 mM respectivamente y fueron filtradas y alicuotadas en condiciones de esterilidad y almacenadas a -20°C. Se decidió evaluar 3 concentraciones de colchicina (0,5, 1,0 y 2,0 mM) y 3 concentraciones de APM (0,05, 0,1 y 0,25 mM), con dos periodos de incubación (44 y 140 h). La concentración de colchicina 0,5 mM durante 44 horas, fue referida como “control”, al ser el tratamiento rutinario utilizado en la empresa. Para

cada tratamiento experimental, se preparó un tubo falcon de 50 ml estéril con medio M404 líquido al que se le añadió el volumen de la disolución del antimetabólico correspondiente a la concentración final deseada, ajustándose después a 20 ml con el medio M404.

Para cada uno de estos tratamientos, se prepararon 20 explantes de cada línea haploide. Con el fin de facilitar la actuación de los agentes antimetabólicos, se realizó una herida en cada yema, realizando un pequeño corte alrededor de la zona de crecimiento de la yema. Una vez preparados los explantes, éstos se introdujeron en tubos falcon correctamente etiquetados introduciendo en cada tubo 40 explantes. Los tubos se colocaron en agitación y oscuridad a 26°C durante 44 horas. Pasadas estas 44 horas, de cada tubo se retiraron 20 explantes, que se lavaron en agua destilada tres veces y se colocaron en medio M404 sólido sin agentes antimetabólicos. El resto de explantes se mantuvieron a 26°C en agitación y oscuridad 96 horas más (hasta 140 horas), tras lo que se limpiaron 3 veces en agua destilada y se colocaron en medio sólido M404 sin agentes antimetabólicos (Figura 2a).

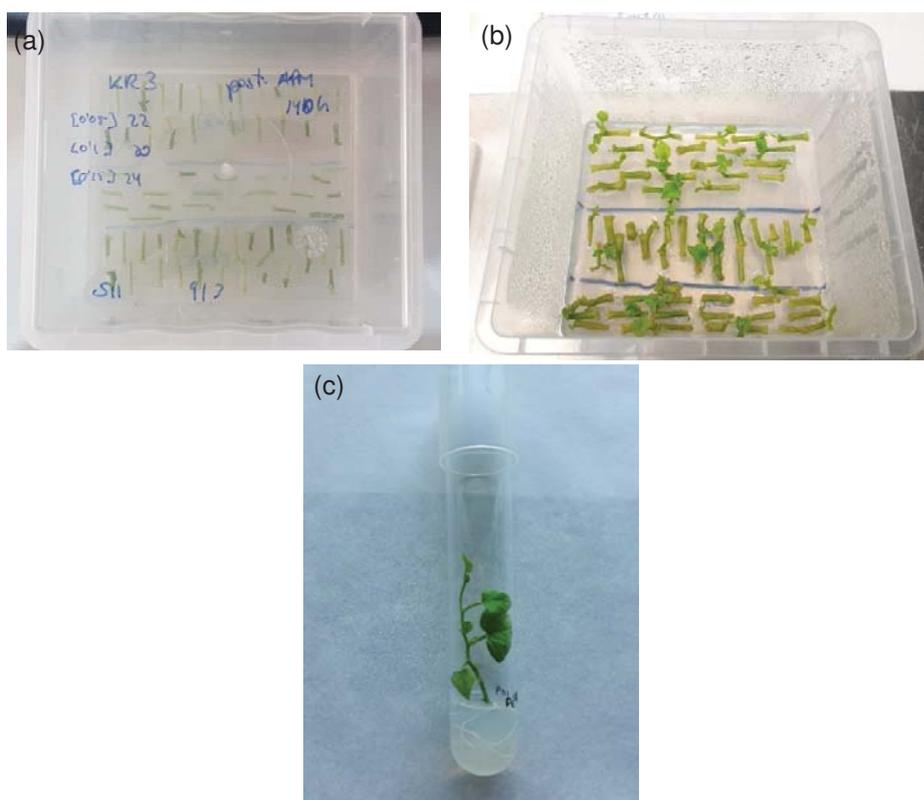


Figura 2- Explantes tras la aplicación del tratamiento antimetabólico y colocados en cajas con medio M404 sólido para el desarrollo de yemas (a). Explantes tras 3 semanas de crecimiento en el fitotrón. Se puede apreciar la aparición de brotes con hojas en alguno de los explantes (b). Planta generada a partir de los brotes separados y cultivados individualmente (c).

Los explantes se cultivaron en condiciones controladas bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz con una intensidad de $200 \mu\text{M m}^2 \text{ s}$ y 8 horas de oscuridad a 26°C en un fitotrón (Panasonic) durante 3 semanas. Pasado este tiempo, se contabilizaron y aislaron los brotes generados a partir de los explantes iniciales (Figura 2b) y se cultivaron en tubos individualizados de vidrio $150 \times 25 \text{ mm}$ con nuevo medio M404 sólido durante otras 3 semanas en fitotrón. Tras este periodo de tiempo las plantas desarrollaron de 4 a 5 hojas expandidas (Figura 2c), y se cogieron de cada planta 1 o 2 hojas que se congelaron a -20°C .

c) Medidas de ploidía

La determinación de la ploidía de las plantas generadas tras la aplicación de los diferentes tratamientos se realizó mediante citometría de flujo y se analizaron suspensiones nucleares a partir de células aisladas de hoja. Para obtener suspensiones nucleares, se tomaron de cada plántula una superficie de $0,5 \text{ cm}^2$ de hoja que se trituró con ayuda de una cuchilla mezclado con 200 ml tampón de extracción de núcleos (sysmex. CyStain UV Precise P). El triturado se mezcló con otros 200 ml del tampón de extracción, y se filtró utilizando filtros comerciales (sysmex. non-sterile CellTrics® filters) para quitar los restos sólidos. Las suspensiones resultantes se conservaron a -20°C hasta la realización de las medidas de la ploidía, que generalmente eran al día siguiente.

Las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo del departamento de mejora vegetal de cítricos del IMIDA. Previo a las medidas de ploidía, las muestras se descongelaron y se añadió a cada muestra 1,6 ml de tampón de tinción (sysmex. CyStain UV Precise P). Este tampón contiene el fluorocromo DAPI, que se une específicamente al DNA presente en los núcleos. El DAPI solo emite fluorescencia cuando se encuentra unido al DNA, por lo que si la muestra presenta una mayor cantidad de DNA habrá una mayor unión de fluorocromo, y por lo tanto se emitirá una mayor cantidad de fluorescencia. Para la calibración del citómetro de flujo (CyFlow Ploidy Analyser, Sysmex), se utilizaron como patrones suspensiones nucleares de plantas haploides y plantas diploides conocidas. Para determinar este nivel de ploidía, se analizó a la salida de datos del citómetro de flujo el ratio de células $n/2n$, clasificando las plantas dependiendo de este ratio:

- **Haploide** (n) si el ratio $n/2n$ era mayor a 1.5.
- **Mixoploide** si el ratio era de 1.5 a 0.5. Este a su vez se dividió en tres subcategorías: si el ratio era de 1.5 a 1.2, el número de células n era mayor al de células $2n$ (**$n > 2n$**), si el ratio era de 1.2 a 0.8, el número de células n

era igual al de células $2n$ ($n=2n$), y si el ratio era de 0.8 a 0.5, el número de células $2n$ era mayor que el de células n ($2n>n$).

- **Dobles Haploide** ($2n$) si el ratio $n/2n$ era menor a 0.5.

d) Análisis de datos

Los datos obtenidos del experimento fueron ordenados y procesados mediante el programa Microsoft Excel y el análisis estadístico fue realizado mediante el programa SPSS. Se calculó para cada uno de los 12 tratamientos, el porcentaje de brotación contando el número de brotes generados a partir de los explantes iniciales, el porcentaje de regeneración contando el número de plantas generadas a partir de los brotes, y el porcentaje de duplicación, contando las plantas dobles haploides, a partir de las plantas generadas en cada caso. El resto de los rangos de ploidía no se tuvieron en cuenta para el porcentaje de duplicación, al ser plantas que no duplicaron completamente su genoma, y que pueden revertir al estado haploide. Estos resultados se reflejan la Figura 2, para los porcentajes de brotación y regeneración, y en la Figura 3 para los porcentajes de duplicación. Para observar el efecto del genotipo, se calcularon, para las 4 líneas del experimento (M13-8, KR-3, Cd-1 y A2-2), los porcentajes de brotación, regeneración y duplicación en cada línea, cuyos datos se recogen en la Figura 4. Se realizaron tres pruebas ANOVA multivariable, a partir del total de explantes, el total de brotes y el total de plantas regeneradas, para comparar la interacción entre las 4 líneas y los 12 tratamientos, para cada variable dependiente (Brotación, Regeneración y Duplicación) (Tabla 1), seguido de una prueba Tukey HSD en cada caso.

Finalmente, para comparar la eficacia entre colchicina y APM y para comparar los dos tiempos de aplicación (44 horas y 140 horas), se agruparon los datos de tratamientos para cada antimitótico por separado (colchicina y APM), y para los dos tiempos de aplicación, calculando nuevamente los porcentajes de brotación, regeneración y duplicación. En estos dos casos, ambos conjuntos de datos se compararon mediante pruebas T student. Estos resultados se reflejan en la Figura 5.

En el apartado de Anexos, se mostraron los número de brotes generados, plantas regeneradas, y plantas dobles haploides en cada una de las condiciones ensayadas (Tabla I) y se mostraron además los rango de ploidía para las plantas generadas (Tabla II). En este caso, se realizó un análisis Tukey HSD, para estudiar las diferencias en cuanto los rangos de ploidía entre concentraciones para un mismo agente antimitótico y tiempo de incubación (Tabla II).

4.2. Resultados

- Efecto de los tratamientos con los agentes antimitóticos sobre el porcentaje de brotación, regeneración y duplicación

El efecto de los agentes antimitóticos colchicina y APM a diferentes concentraciones sobre los porcentajes de brotación y regeneración tras 44 horas y 140 horas de incubación se muestra en la Figura 2. En la Tabla I de Anexos se detalla el número de brotes y plantas obtenidos en cada tratamiento. Como se observa en la Figura 2, el porcentaje de brotación disminuye conforme aumenta la concentración del agente antimitótico empleado tanto con colchicina como con APM, siendo esta disminución más acusada a las 140 h de tratamiento. El mayor porcentaje de brotación (55%) se registró en los tratamientos en los que se utilizó una concentración de colchicina de 0,5 mM y un periodo de incubación de 44h (Figura 2a) y el menor porcentaje de brotación (11%) se obtuvo con APM a una concentración de 0,25 mM durante 140 h (Figura 2b). Con colchicina el porcentaje de regeneración, tras 44 h de incubación, osciló entre el 43-48% (Figura 2a) y, a las 140 h de tratamiento, este porcentaje fue del 55% cuando se utilizó una concentración de colchicina de 0,5 mM (Figura 2b). Con AMP, el porcentaje de regeneración medio observado fue del 60%, registrándose un valor máximo de 69% en los tratamientos con una concentración de AMP de 0,1 mM y un periodo de incubación de 44h (Figura 2a). No obstante, conviene tener en cuenta que las diferencias observadas no fueron significativas según el test HSD Tukey.

El efecto de los agentes antimitóticos sobre la duplicación, **es decir el número de plantas dobles haploides obtenidas**, se muestra en la Figura 3. En este experimento, no se observaron diferencias entre los distintos tratamientos respecto al porcentaje de duplicación (Figura 3). No obstante, el mayor número de dobles haploides generados se registró con el tratamiento de colchicina a una concentración de 0,5 mM durante un periodo de incubación de 44 h (3 plantas dobles haploides), mientras que no consiguieron generar plantas dobles haploides en ninguno de los tratamientos realizados con AMP a las 44 h de incubación. Sin embargo, cuando el periodo de incubación fue de 140 h, se consiguió regenerar una planta doble haploide en todos los tratamientos con AMP ensayados (0,05, 0,1 y 0,25 mM) y, con colchicina, sólo en los tratamientos de 0,5 mM. En la Tabla II de Anexos se detalla el rango de ploidías (haploide, mixoploide y doble haploide) en cada tratamiento, en cada una de las variedades de melón ensayadas. Respecto a los diferentes rangos de ploidía analizados, no se observaron diferencias significativas en ninguna de las

concentraciones de colchicina y APM estudiadas (Anexos, Tabla II). Cada uno de estos tipos de plantas, además de un ratio n/2n diferente, presentaron una curva a la salida de citómetro de flujo característica (Figura 6).

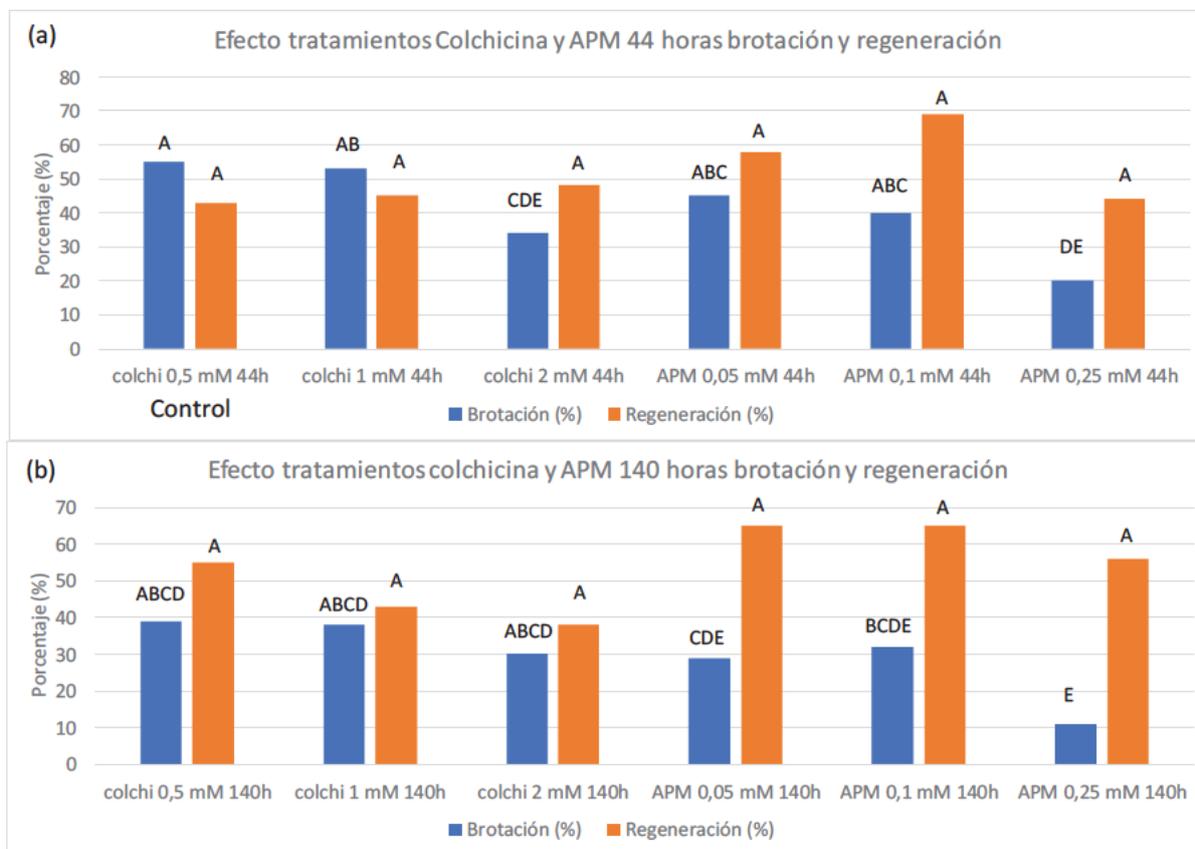


Figura 2- Porcentajes de brotación y regeneración para los tratamientos con colchicina y APM a diferentes concentraciones, tras 44 horas de incubación (a) y tras 140 horas de incubación (b). Los porcentajes de brotación se calcularon a partir de los explantes iniciales. Los porcentajes de regeneración se calcularon a partir del número total brotes. El análisis estadístico se realizó mediante HSD Tukey. Las letras ^{ABDCE} representan los diferentes subconjuntos homogéneos.

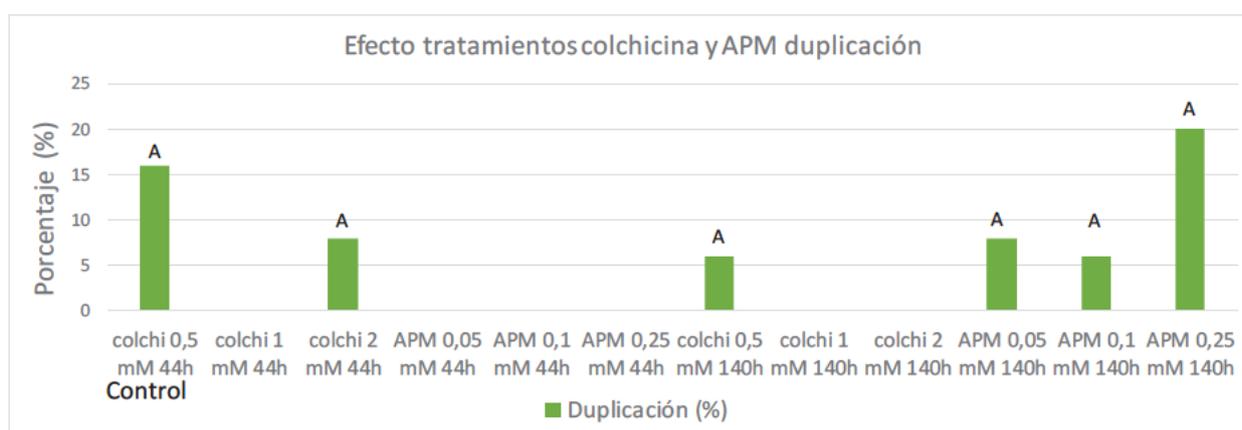


Figura 3- Porcentajes de duplicación (porcentaje de plantas dobles haploides) para los tratamientos con colchicina y APM a diferentes concentraciones, 44 y 140 horas de incubación de los agentes. Los porcentajes de duplicación se calcularon a partir del número total de plantas generadas en cada caso. El análisis estadístico se realizó mediante HSD Tukey. La letra ^A representa los diferentes subconjuntos homogéneos.

- Efecto del genotipo sobre los porcentaje de brotación, regeneración y duplicación

Así mismo, también se evaluó el efecto del genotipo sobre los porcentajes de brotación, regeneración y duplicación, y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4. En las Tablas I de Anexos se detalla el número de brotes y plantas obtenidos en cada línea. Se observaron grandes diferencias entre las distintas variedades de melón analizadas (“Piel de Sapo”, “Amarillo” y “Galia”). Así, el mayor porcentaje de brotación se observó en la línea KR-3 (60%), seguido de las líneas Cd-1 (40%), A2-2 (25%) y finalmente la línea M13-8 (17%) (Figura 4a). En cuanto a regeneración se repitió de forma similar, siendo la líneas KR-3 la que presentó una mayor porcentaje de regeneración (68%), seguidos de las líneas Cd-1 y M13-8, mientras que el menor porcentaje de regeneración se registró con la línea A2-2 (27%) (Figura 4a). En cuanto a duplicación, no se observaron diferencias significativas entre las líneas (Figura 4b).

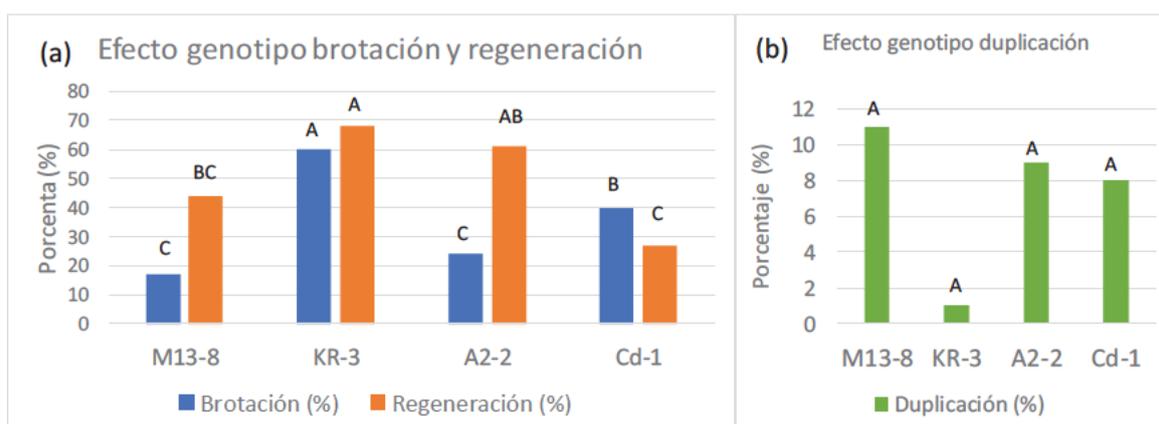


Figura 4- Porcentajes de brotación y regeneración (a) y porcentajes de duplicación (b) para las líneas utilizadas en el experimento. Los porcentajes de brotación se calcularon a partir de los explantes iniciales. Los porcentajes de regeneración se calcularon a partir del número total brotes. Los porcentajes de duplicación se calcularon a partir del número total de plantas. El análisis estadístico se realizó mediante HSD Tukey. La letras ^{ABC} representa los diferentes subconjuntos homogéneos.

- Comparación entre los agentes antimitóticos colchicina y APM y entre los tiempos de incubación 44 y 140 horas

La comparación entre los agentes antimitóticos colchicina y APM (independientemente de su concentración), y entre los tiempos de aplicación, para los porcentajes de brotación, regeneración y duplicación se muestran en la Figura 5. Tras comparar los **agente utilizados**, se observaron diferencias en la brotación y en la regeneración, de forma que independientemente de las variedades utilizadas y la concentración, los explantes tratados con colchicina, presentaron una mayor brotación (41% respecto al 30% del APM), aunque, la tasa regeneración a planta completa fue

mayor en los tratamientos con APM (61% respecto al 45% de la colchicina) (Figura 5a). En relación con el **tiempo de aplicación**, sólo se observaron diferencias respecto al porcentaje de brotación, siendo dicho porcentaje mayor tras un periodo de aplicación de 44 horas (41% frente a 30% con 140 horas) (Figura 5b).

Al analizar el número de plantas dobles haploides obtenidas, la duplicación cromosómica, no se observaron diferencias significativas entre la colchicina y el AMP, ni con el tiempo de incubación. Sin embargo, cabe destacar que en los tratamientos a 140 h se obtuvieron un mayor número de plantas **mixoploides** del tipo $2n>n$ (Figura 6d) frente a los tratamientos a 44 h (10 plantas en los tratamientos a 140 horas de aplicación frente a 3 plantas en los tratamientos a 44 horas, con una significación del 95%). A partir de estas plantas, según experiencias previas del laboratorio, se pueden tomar segmentos nodales, y es posible generar plantas dobles haploides a partir de alguna de las yemas laterales aisladas. Sin embargo, si se parte de plantas con mixoploidías $2n=n$ y $n>2n$ (Figura 6b y 6c) esto hecho no suele ocurrir, y las plantas generadas terminan siendo haploides (Figura 6a).

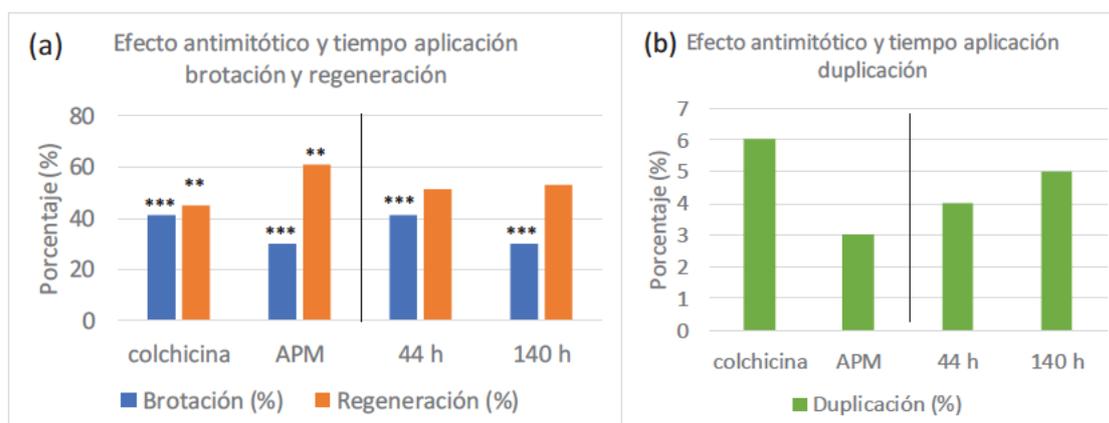


Figura 5- Efecto de los antimitóticos y el tiempo de aplicación sobre la brotación y regeneración (a), y sobre la duplicación (b). Los porcentajes de brotación se calcularon a partir de los explantes iniciales. Los porcentajes de regeneración se calcularon a partir del número total brotes. Los porcentajes de duplicación se calcularon a partir del número total de plantas. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba T student. Los * representa aquellos el nivel de significación para el 99% (**) y 99,9% (***) en parámetros en los que se observaron diferencias significativas.

- Estudio de la varianza entre factores

El análisis de la varianza para los tratamientos y para las líneas de genotipo se muestra en la Tabla 1. En nuestro estudio se observó que el porcentaje de brotación dependió tanto del genotipo (variedad) (99,9% de significación) como de los tratamientos utilizados (99,9% de significación), mientras que el porcentaje de regeneración dependió del genotipo (99,9% de significación), pero no de los

tratamientos. La duplicación, fue también dependiente del genotipo (99% significación) pero en mayor medida de los tratamientos (99,9% de significación).

Tabla 1- Análisis de la varianza entre Líneas y Tratamiento. Se detalla la significación de las líneas, los tratamientos y la interacción entre estos, para cada una de las variables dependientes analizadas: Brotación, regeneración y duplicación.

Brotación				Regeneración				Duplicación			
	gl	F	Sig		gl	F	Sig		gl	F	Sig
Líneas	3	50,824	***	Líneas	3	20,832	***	Líneas	3	5,779	**
Tratamiento	11	7,072	***	Tratamiento	11	1,561	ns	Tratamiento	11	3,848	***
L*T	33	0,541	***	L*T	30	1,961	**	L*T	28	2,966	***

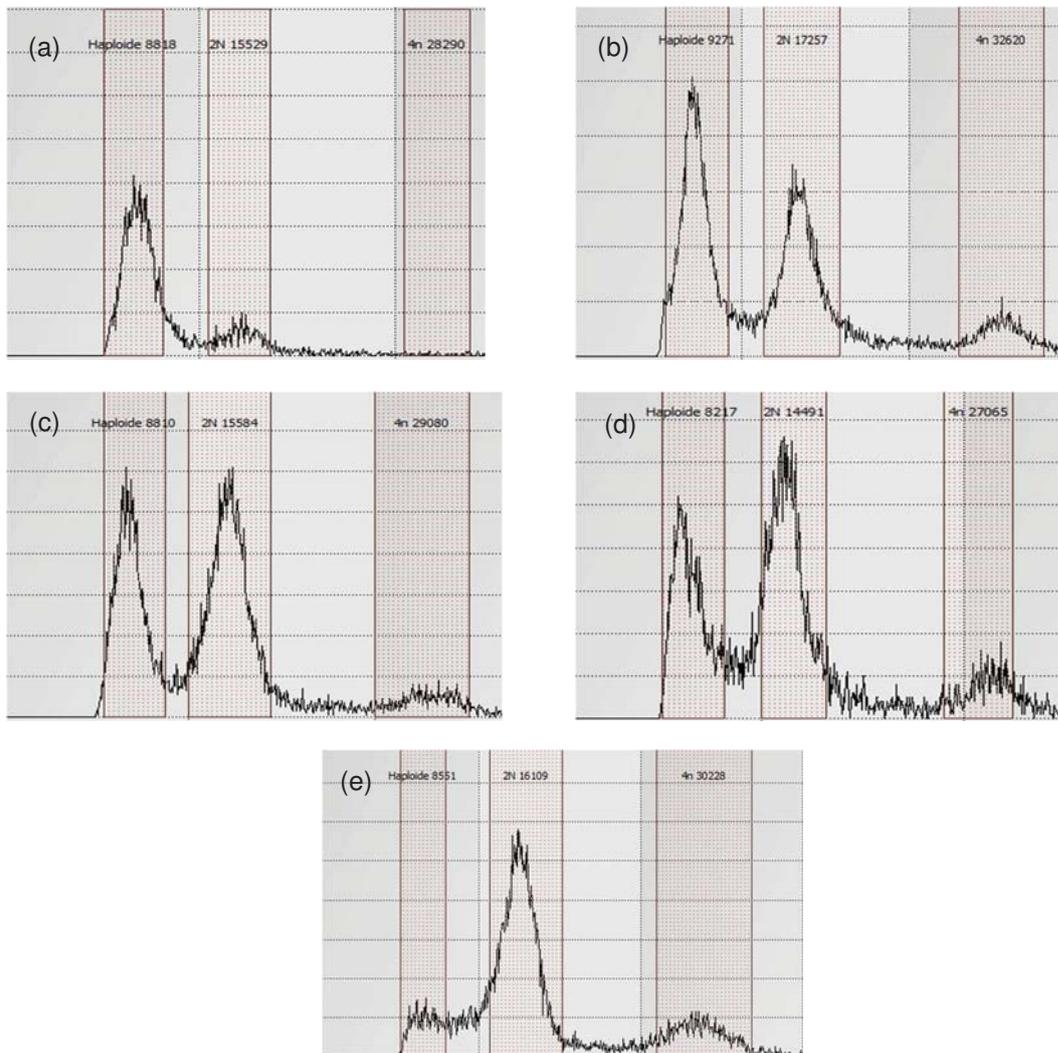


Figura 6- Salida de datos en el citómetro de flujo. Se muestra la gráfica típica para una planta haploide (a), Mixoploide: $n > 2n$ (b), $n = 2n$ (c), $2n > n$ (c), y doble haploide (e). Los rangos de células n , $2n$ y $4n$ se marcaron previamente, mediante la utilización de suspensiones nucleares conocidas de plantas haploides y diploides.

4.4. Discusión

El objetivo de este trabajo fue el de optimizar el proceso de duplicación cromosómica en plantas haploides de *Cucumis melo* L. La eficiencia del protocolo experimental realizado fue, en general muy baja ya que se obtuvo un porcentaje de brotación medio del 35% de los cuales, solo un 52% regeneró a planta completa y finalmente de estas plantas sólo un 4,5% fueron dobles haploides (Figura 6e), lo que supone un 0,8% del total de explantes. Esta baja eficiencia en el proceso de formación de dobles haploides en melón es muy frecuente en la bibliografía. Así, Lotfi *et al.*, 2003, utilizando la variedad de melón “*Indorus*” y colchicina a diferentes concentraciones (0,625 mM y 1,25 mM) y dos tiempo de aplicación (3 y 6 h), observaron que el tratamiento más eficaz fue el de 1,25 mM durante 3 horas. Estos autores utilizaron 86 explantes y solo 69 regeneraron a plantas completas, y de éstas sólo 8 eran dobles haploides, lo que supone un 12% de duplicación cromosómica. Los tratamientos con 0,625 mM de colchicina solo consiguieron regenerar 1 planta doble haploide, lo que supuso un 3 y 2 % de duplicación cromosómica. Por su parte, Lim & Earle, 2008 consiguieron, a partir de 51 explantes de la variedad de melón “Oro rico”, la regeneración de 20 plantas, pero solo dos de ellas fueron dobles haploides (4% duplicación) utilizando para ello colchicina a una concentración de 1,25 mM durante 3 horas. Otro fenómeno descrito en la bibliografía es una mayor mortalidad tras aplicar concentraciones más elevadas de antimitótico, lo cual ocurre en nuestro estudio. Lim & Earle, 2008 obtuvieron una mayor mortalidad tras aplicar concentraciones de 2,5 mM de colchicina, respecto a concentraciones de 1,25 mM.

En nuestro estudio, no se observaron diferencias entre variedades para los porcentajes de duplicación debido al pequeño número muestral, pero en la bibliografía se han descrito diferencias como las reseñadas en el trabajo de Gonzalo *et al.*, 2011. En dicho estudio, tras evaluar la producción de dobles haploides en cuatro variedades diferentes de melón (“Piel de Sapo”, “Catalupo” “Amarilla”, y “Galia”), observaron diferencias respecto al número de dobles haploides generados entre líneas diferentes dentro de la misma variedad (“Piel de Sapo”), así como diferencias entre la obtención de dobles haploides fértiles entre las distintas variedades, siendo las variedades “Amarilla” y “Galia” donde no se obtuvieron plantas haploides.

Respecto a la evaluación del efecto del antimitótico APM como alternativa a la colchicina, salvo para la capacidad de regeneración de los brotes, no se observaron mejores resultados en la utilización de APM respecto a la colchicina. Estos resultados contrastan con los observados por Wang *et al.*, 2015, ya que al comparar el uso de

colchicina y APM en melón oriental, tras la aplicación de APM 0,08 mM durante 144 horas consiguieron una regeneración del 70% y un porcentaje de duplicación del 15%, mientras que con colchicina, el mejor tratamiento (1 mM durante 144 horas) presentó un porcentaje de duplicación del 8% y una regeneración inferior al 65%. A diferencia del ensayo descrito en esta memoria, en este experimento los antimitóticos se aplicaron a semillas diploides.

En este experimento no se ha conseguido mejorar la eficiencia del proceso de duplicación cromosómica respecto al tratamiento "control" (0,5 mM de colchicina durante 44 horas) y además muchos de los tratamientos ensayados a mayores concentraciones y tiempos de aplicación, aunque no eran significativamente diferentes respecto a la duplicación, sí que tenían menores porcentajes de brotación. Una posible forma de mejorar la eficiencia de proceso sería la utilización de reguladores del crecimiento durante el proceso de regulación cromosómica. Lim & Earle, 2009, tras un proceso de duplicación cromosómica utilizando una concentración de colchicina de 1,25 mM durante 12 horas, consiguieron aumentar el porcentaje de regeneración de un 40% a un 88% al cultivar los explantes tratados con colchicina un medio con AIA BAP, ABA y AgNO₃, utilizado como fuente de nitrógeno inorgánico.

Otra alternativa interesante sería la aplicación del agente antimitótico "*in vivo*". Este enfoque ha sido evaluado por ejemplo por Koksall *et al.*, 2002, en el cual se compararon diferentes métodos de aplicación de colchicina, siendo el método más eficaz la inmersión de yemas apicales de plántulas en una solución con colchicina 12,5 mM durante 2 horas, con un ratio de duplicación del 88% a partir de 50 plantas regeneradas. Solmaz *et al.*, 2016, compararon este método de inmersión de yemas apicales con el método "*in vitro*" mediante segmentos nodales, y en este caso dio mejores resultados el método de inmersión aumentando el porcentaje de duplicación del 10% al 46% respectivamente.

5. Conclusiones

La técnica de generación de dobles haploides es una técnica que puede ser muy útil en algunas especies y puede plantearse como alternativa para la generación de parentales en los procesos de mejora genética. Sin embargo, este proceso está fuertemente condicionado por el genotipo de partida, lo que va a influenciar tanto la obtención de haploides, como la eficiencia de la duplicación cromosómica. Por dicho motivo, no existe un protocolo universal para la obtención de dobles haploides en plantas, y es necesario optimizar los protocolos en función del tipo de especie, llegando incluso a ser necesario protocolos específicos para diferentes variedades, y líneas dentro de una misma variedad, lo que hace difícil su aplicación práctica a gran escala en muchos casos, como ocurre en melón.

En cuanto al ensayo experimental, los resultados mostraron que el tratamiento utilizado en la empresa de forma rutinaria (colchicina 0.5 mM durante 44 horas) fue el más efectivo al presentar un mayor porcentaje de brotación y duplicación. El ajuste de concentraciones y tiempos de aplicación realizados no permitió mejorar la producción de plantas dobles haploides respecto al protocolo seguido por la empresa. En cuanto a la utilización de un agente alternativo a la colchicina, las condiciones ensayadas con APM, aunque tuvieron mejores resultados respecto al porcentaje de regeneración, tampoco consiguieron mejorar el protocolo establecido en la empresa. Sin embargo, debemos tener en cuenta que los resultados presentados en este TFM son fruto de un solo experimento inicial ya que la situación de pandemia COVID-19 impidió poder acudir de forma presencial a la empresa y por tanto poner a realizar el resto de los experimentos planteados.

Por lo tanto, las condiciones ensayadas han conseguido mejorar el proceso de duplicación cromosómica, y que es necesario abordar nuevos ensayos experimentales, para conseguir aumentar la eficiencia en el proceso de duplicación cromosómica, ajustando mejor el tamaño muestral, y los tiempos de aplicación e incubación del agente, de forma que no se comprometa la brotación, o bien añadiendo al medio reguladores hormonales para aumentar la capacidad de regeneración.

6. Bibliografía

- Abdollahi, M. R. & Rashidi, S. (2017) 'Production and conversion of haploid embryos in chickpea (*Cicer arietinum* L.) anther cultures using high 2,4-D and silver nitrate containing media', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer Netherlands, 133(1), pp. 39–49. doi: 10.1007/s11240-017-1359-4.
- Ahmadi, B. & Ebrahimzadeh, H. (2020) 'In vitro androgenesis: spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants', *Plant Cell Reports*. Springer Berlin Heidelberg, 39(3), pp. 299–316. doi: 10.1007/s00299-020-02509-z.
- Allum, J. F., Bringle, D. H. and Roberts, A. V. (2007) 'Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of in vitro nodes to oryzalin: The effects of node length, oryzalin concentration and exposure time', *Plant Cell Reports*, 26(11), pp. 1977–1984. doi: 10.1007/s00299-007-0411-y.
- Bhuvaneshwari, G., Thirugnanasampandan, R. & Gogulramnath, M. (2020) 'Effect of colchicine induced tetraploidy on morphology, cytology, essential oil composition, gene expression and antioxidant activity of *Citrus limon* (L.) Osbeck', *Physiology and Molecular Biology of Plants*. Springer India, 26(2), pp. 271–279. doi: 10.1007/s12298-019-00718-9.
- Bilyska, O. V. (2020) 'Influence of spike pretreatment at low temperatures on efficiency of spring barley haploid production in anther culture *in vitro*', *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 30(1), pp. 68–76. doi: 10.15407/cryo30.01.068.
- Blakeslee, A. F., Belling, J., Farham, M. E. & Bergner, A. D. (1922) 'A haploid mutant in the Jimson Weed, "*datura stramonium*"', *Science*, 55(1433), pp. 646–647. doi: 10.1126/science.55.1433.646.
- Blakeslee, F. & Avery, A. G. (1937) 'Methods of Inducing Doubling of chromosomes in plants', *The Journal of Heredity*, pp. 393–411.
- Blasco, M., Badenes, M. L. & Naval, M. M. (2016) 'Induced parthenogenesis by gamma-irradiated pollen in loquat for haploid production', *Breeding Science*, 66(4), pp. 606–612. doi: 10.1270/jsbbs.16021.
- Bohanec, B. (2008) 'Doubled Haploids via Gynogenesis', *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, pp. 35–46. doi: 10.1007/978-1-4020-8854-4_2.
- Branham, S. E., Daley, J., Levi, A., Hassel, R. & Wechter, P. (2020) 'QTL Mapping and Marker Development for Tolerance to Sulfur Phytotoxicity in Melon (*Cucumis melo*)', *Frontiers in Plant Science*, 11(July), pp. 1–9. doi: 10.3389/fpls.2020.01097.
- Britt, A. B. & Kupp, S. (2016) 'CenH3: An emerging player in haploid induction technology', *Frontiers in Plant Science*, 7(APR2016), pp. 1–10. doi: 10.3389/fpls.2016.00357.
- Burger, Y., Paris, H. S., Cohen, R., Katzir, N., Tadmor, Y. & Lewinsohn, E. (2010) 'Genetic Diversity of *Cucumis Melo*', *Horticultural Reviews*, 36, pp. 165–198. doi: 10.1002/9780470527238.ch3.
- Chen, F., Zhu, Z., Tong, L., Guo, X., Xu, S., Chen, J., Wu, J. & Zhu, Z. (2020) 'Production of allohexaploid *Brassica* hybrid between tuber mustard (*Brassica juncea* L. var. *crassicaulis* Chen & Yang) and Chinese kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra* Bailey)', *Scientia Horticulturae*. Elsevier, 270(October 2019). doi: 10.1016/j.scienta.2020.109412.
- Chen, J. F., Cui, L., Malik, A. A. & Mbir, K. G. (2011) 'In vitro haploid and dihaploid production via unfertilized ovule culture', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(3), pp. 311–319. doi: 10.1007/s11240-010-9874-6.

Claveria, E., Garcia-Mas, J. & Dolcet-Sanjuan, R. (2005) 'Optimization of cucumber doubled haploid line production using in vitro rescue of in vivo induced parthenogenic embryos', *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(4), pp. 555–560. doi: 10.21273/jashs.130.4.555.

Corral-Martínez, P. (2013) 'Obtención de dobles haploides en especies de interés agronómico: análisis de agentes y mecanismos celulares implicados en la inducción.', pp. 1–102.

Dal, B., Sari, N. & Solmaz, İ. (2016) 'Effect of different irradiation sources and doses on haploid embryo induction in altinbas (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*) melons', *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 40(4), pp. 552–559. doi: 10.3906/tar-1511-27.

Deng, Y., Tang, B., Zhou, X., Fu, W., Tao, L., Zhang, L. & Chen, J. (2020) 'Direct regeneration of haploid or doubled haploid plantlets in cucumber (*Cucumis sativus* L.) through ovary culture', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer Netherlands, 142(2), pp. 253–268. doi: 10.1007/s11240-020-01839-w.

Dewi, I. S., Safitri, H. & Purwoko, B. S. (2020) 'Effect of sucrose on calus induction and green plantlet regeneration in anther culture of Indica x Indica rice', *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 484, p. 012023. doi: 10.1088/1755-1315/484/1/012023.

Domblides, A. S. (2017) 'Anther and ovule in vitro culture in carrot (*Daucus carota* L.)', *Acta Horticulturae*, 1153, pp. 55–60. doi: 10.17660/ActaHortic.2017.1153.9.

Dunemann, F., Unkel, K. & Sprink, T. (2019) 'Using CRISPR/Cas9 to produce haploid inducers of carrot through targeted mutations of centromeric histone H3 (CENH3)', *Acta Horticulturae*, 1264(September), pp. 211–219. doi: 10.17660/ActaHortic.2019.1264.26.

Dunwell, J. M. (2010) 'Haploids in flowering plants: Origins and exploitation', *Plant Biotechnology Journal*, 8(4), pp. 377–424. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT Crops. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>.

Forster, B. P., Heberle-Bors, E., Kasha, K. J. & Touraev A. (2007) 'The resurgence of haploids in higher plants', *Trends in Plant Science*, 12(8), pp. 368–375. doi: 10.1016/j.tplants.2007.06.007.

Fritsche-Neto, R., Garbuglio, D. D. & Borém, A. (2014) *Double Haploids, Biotechnology and Plant Breeding: Applications and Approaches for Developing Improved Cultivars*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-418672-9.00009-X.

Gallard, A., Op-Den, H. M. & Van, P. J. (2017). Method for the production of haploid and subsequent double haploid plants. Patente nº WO 2017/200386 A1.

Gao, Y., Jia, J., Cong, J., Ma, Y., Feng, H. & Zhang, Y. (2019) 'Non-ionic surfactants improved microspore embryogenesis and plant regeneration of recalcitrant purple flowering stalk (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *purpurea* Bailey)', *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 56(2), pp. 207–214. doi: 10.1007/s11627-019-10033-3.

Garcia-Mas, J., Benjak, A., Sanseverino, W., Bourgeois, M., Mir, G., González, V. M., Hénaff, E., Cámara, F., Cozzuto, L., Lowy, E., Alioto, T., Capella-Gutiérrez, S., Blanca, J., Cañizares, J., Ziarsolo, P., González-Ibeas, D., Rodríguez-Moreno, L., Droege, M., Du, L., Alvarez-Tejado, M., Lorente-Galdos, B., Melé, M., Yang, L., Weng, Y., Navarro, A., Marques-Bonet, T., Aranda, M. A., Nuez, F., Picó, B., Gabaldón, T., Roma, G., Guigó, R., Casacuberta, J. M., Pere, A. & Puigdomenech, P. (2012) 'The genome of melon (*Cucumis melo* L.)', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(29), pp. 11872–11877. doi: 10.1073/pnas.1205415109.

Germanà, M. A. (1997) 'Haploidy in Citrus', 5, pp. 195–217. doi: 10.1007/978-94-017-1856-1_11.

- Germanà, M. A. (2011) 'Anther culture for haploid and doubled haploid production', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(3), pp. 283–300. doi: 10.1007/s11240-010-9852-z
- Gonzalo, M. J., Claveria, E., Monforte, J A. & Dolcet-Sanjuan, R.. (2011) 'Parthenogenic Haploids in Melon: Generation and Molecular Characterization of a Doubled Haploid Line Population', *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136(2), pp. 145–154. doi: 10.21273/jashs.136.2.145.
- Groups, W. (2006) 'COST Action 851 Gametic cells and molecular breeding for crop', (November 2001), pp. 1–41.
- Guha, S. & Maheshwari, S. C. (1964) 'In vitro production of embryos from anthers of datura [39]', *Nature*, 204(4957), p. 497. doi: 10.1038/204497a0.
- Haring, F., Rantetandung, S., Riadi, M., Rafiuddin & Sjahril, R: (2020) 'Selection of purification and formation of double haploid Toraja endemic black rice through anther culture', *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 486(1). doi: 10.1088/1755-1315/486/1/012102.
- Hooghvorst, I., Ramos-Fuentes, E., López-Cristofanninni, C., Ortega, M., Vidal, R., Serrat, X. & Nogués, S. (2018) 'Antimitotic and hormone effects on green double haploid plant production through anther culture of Mediterranean japonica rice', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer Netherlands, 134(2), pp. 205–215. doi: 10.1007/s11240-018-1413-x.
- Hooghvorst, I., Torrico, O., Hooghvorst, S. & Nogués, S. (2020) 'In situ Parthenogenetic Doubled Haploid Production in Melon "Piel de Sapo" for Breeding Purposes', *Frontiers in Plant Science*, 11(April). doi: 10.3389/fpls.2020.00378.
- Iacuzzi, N., Aleza, P., Gracia-Lor, A. & Germnà, M. A. (2019) 'Somatic embryogenesis through in vitro anther culture of *Citrus sinensis* L. Osbeck "Moro"', *Acta Horticulturae*, 1230, pp. 23–31. doi: 10.17660/ActaHortic.2019.1230.4.
- Ishii, T., Karimi-Ashtiyani, R. & Houben, A. (2016) 'Haploidization via Chromosome Elimination: Means and Mechanisms', *Annual Review of Plant Biology*, 67, pp. 421–438. doi: 10.1146/annurev-arplant-043014-114714.
- Kalinowska, K., Chamas, S., Unkei, K., Demidov, D., Lermontonva, I., Dresselhaus, T., Kumlehn, J., Dunemann, F. & Houben, A. (2019) 'State-of-the-art and novel developments of in vivo haploid technologies', *Theoretical and Applied Genetics*. Springer Berlin Heidelberg, 132(3), pp. 593–605. doi: 10.1007/s00122-018-3261-9.
- Kaur, H. A., Sharma, S. P., Kaur, N. & Kalia, A. (2019) 'Gynogenic response of muskmelon genotypes with temperature and MS medium supplementations', *Acta Horticulturae*, 1255, pp. 13–17. doi: 10.17660/ActaHortic.2019.1255.3.
- Kelliher, T., Starr, D., Xiujuan, S., Guozhu, T., Chen, Z., Carter, J., Wittich, P. E., Dong, S., Green, J., Burch, E., McCuiston, J., Gu, W., Sun, Y., Strebe, T., Roberts, J., Bate, N. J. & Que, Q. (2019) 'One-step genome editing of elite crop germplasm during haploid induction', *Nature Biotechnology*. Springer US, 37(3), pp. 287–292. doi: 10.1038/s41587-019-0038-x.
- Khan, P. S. S. V., Vijayalakshmi, G., Raja, M. M., Nalk, M. L., Germaná, M. A. & Terry, R. G. (2020) 'Doubled haploid production in onion (*Allium cepa* L.): from gynogenesis to chromosome doubling', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer Netherlands, 142(1), pp. 1–22. doi: 10.1007/s11240-020-01831-4.
- Koksal, N., Yetisir, H., Sari, N. & Abak, K. (2002) 'Comparison of different in vivo methods for chromosome duplication in muskmelon (cucumis melo)', *Acta Horticulturae*, 588, pp. 293–298. doi: 10.17660/ActaHortic.2002.588.46.
- Kundu, M., Dubey, A., Srivastav, M. & Malik, S. (2017) 'Induction of haploid plants in citrus through gamma-irradiated pollen and ascertainment of ovule age for maximum recovery of haploid plantlets', *Turkish Journal of Biology*, 41(3), pp. 469–483. doi: 10.3906/biy-1606-28.

- Kurtar, E. S., Balkaya, A. & Kandemir, D. (2016) 'Evaluation of haploidization efficiency in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) through anther culture', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer Netherlands, 127(2), pp. 497–511. doi: 10.1007/s11240-016-1074-6.
- Lelivelt, C. L. C., Movahedi, S. & Van Dun, M. P. (2017) Non-Transgenic Haploid Inducer lines in cucurbits. Patente n° WO 2017/081011 A1.
- Li, L. L., Huang, S., Hou, J., Gao, L., Li, Q., Li, Y., Zhu, H., Yang, L. & Jian-Bin, H. (2020) 'Construction of a high-density genetic map for melon using ddRAD-Seq technology from a population derived from flexuosus and reticulatus botanical groups', *Scientia Horticulturae*, 272(May), pp. 1–5. doi: 10.1016/j.scienta.2020.109531.
- Liborio-Stipp, L. C., Januzzi-Mendes, B. M., Stefano-Piedade, S. M. D. & Marinelli-Rodriguez, A. P. (2001) 'In vitro morphogenesis of *Cucumis melo* var. *inodorus*', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65(1), pp. 81–89. doi: 10.1023/A:1010684922210.
- Lim, W. & Earle, E. D. (2008) 'Effect of in vitro and in vivo colchicine treatments on pollen production and fruit set of melon plants obtained by pollination with irradiated pollen', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 95(1), pp. 115–124. doi: 10.1007/s11240-008-9422-9.
- Lim, W. & Earle, E. D. (2009) 'Enhanced recovery of doubled haploid lines from parthenogenetic plants of melon (*Cucumis melo* L.)', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 98(3), pp. 351–356. doi: 10.1007/s11240-009-9563-5.
- Liu, L. Z., Chitrampalam, P. R., Zhai, W. Q., Chen, Y. Y., Zhu, W. M. & Shi, B. (2013) 'Efficient plant regeneration in three cultivars of Hami melon [*Cucumis melo* L. ssp. *melo* convar. *ameri* (Pang.) Greb] via organogenesis', *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88(4), pp. 415–420. doi: 10.1080/14620316.2013.11512985.
- Lotfi, M., Alan, A. R., Henning, M. J., Jahn, M. M. & Earle, E. D. (2003) 'Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance', *Plant Cell Reports*, 21(11), pp. 1121–1128. doi: 10.1007/s00299-003-0636-3.
- Lu, X., Wu, H., Zhang, Q., Sun, W., Chen, X., Wu, X. & Chen, Y. (2020) 'Induction of pollen embryo and chromosome doubling in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)', *Turkish Journal of Botany*, 44(1), pp. 76–84. doi: 10.3906/bot-1903-34.
- Maluszynska, J. (2003) 'Cytogenetic tests for ploidy level analyses — chromosome counting', *Doubled Haploid Production in Crop Plants*, pp. 391–395. doi: 10.1007/978-94-017-1293-4_51.
- Marcińska, I., Czyczyło-Mysza, I., Skrzypek, E., Warchol, M., Zielinski, K. & Dubas, E. (2018) 'Obtaining of winter rye (*secale cereale* L. ssp. *cereale*) haploid embryos through hybridization with maize (*Zea Mays* L.)', *Cereal Research Communications*, 46(3), pp. 521–532. doi: 10.1556/0806.46.2018.029.
- Mehta, I., Chaudhary, H. K., Sharma, P., Manoj, N. V., Singh, K. & Sran, R. S. (2020) 'In vivo colchicine manipulation for enhancing DH production efficiency in *Triticum durum* using *Imperata cylindrica*-mediated chromosome elimination approach', *Cereal Research Communications*. Springer International Publishing, 48(2), pp. 217–224. doi: 10.1007/s42976-020-00018-z.
- Mendi, Y. Y., Eldogan, S., Gutakev, R., Ipek, M., Curuk, P. & Cetiner, S. (2010) 'Regeneration and histological analysis of snake melon (*Cucumis melo* var. *flexuosus* (L.) Naudin) by direct organogenesis', *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 34(4), pp. 309–317. doi: 10.3906/tar-0905-8.
- Murovec, J. & Bohanec, B. (2012) 'Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding 5 Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding'. doi: 10.5772/29982.

Niazian, M. & Shariatpanahi, M. E. (2020) 'In vitro-based doubled haploid production: recent improvements', *Euphytica*. Springer Netherlands, 216(5), pp. 1–21. doi: 10.1007/s10681-020-02609-7.

Núñez-Palenius, H. G., Gómez-Lim, M., Ochoa-Alejo, N., Grumet, R., Lester, G. & Cantiffe, D. J. (2008) 'Melon fruits: Genetic diversity, physiology, and biotechnology features', *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(1), pp. 13–55. doi: 10.1080/07388550801891111.

Pasqual, M., Soares, J. D. R. & Rodrigues, F. A. (2014) *Tissue Culture Applications for the Genetic Improvement of Plants, Biotechnology and Plant Breeding: Applications and Approaches for Developing Improved Cultivars*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-418672-9.00007-6.

Pazuki, A., Aflaki, F., Gürel, E., Ergül, A. & Gürel, S. (2018) 'Gynogenesis Induction in Sugar Beet (*Beta vulgaris*) Improved by 6-Benzylaminopurine (BAP) and Synergized with Cold Pretreatment', *Sugar Tech*, 20(1), pp. 69–77. doi: 10.1007/s12355-017-0522-x.

Pazuki, A., Aflaki, F., Gürel, S., Ergül, A. & Gürel, E. (2018) 'Production of doubled haploids in sugar beet (*Beta vulgaris*): an efficient method by a multivariate experiment', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer Netherlands, 132(1), pp. 85–97. doi: 10.1007/s11240-017-1313-5.

Pitrat, M. (2008) 'Melon', *Handbook of plant Breeding*. Springer. ISSN: 2363-8478.

Podwyszyńska, M., Sowik, I., Machalanska, A. & Kruczynska, D. (2017) 'In vitro tetraploid induction of *Malus × domestica* Borkh. using leaf or shoot explants', *Scientia Horticulturae*, 226(August), pp. 379–388. doi: 10.1016/j.scienta.2017.08.042.

Rather, S. A., Chaudhary, H. K. & Kaila, V. (2017) 'Pollen preservation potential of imperata cylindrica-an efficient source for doubled haploid production in wheat', *Cereal Research Communications*, 45(3), pp. 525–534. doi: 10.1556/0806.45.2017.026.

Reche, J. (2008) *Cultivo del melón en invernadero*, Generalitat Valenciana Conselleria d'Agricultura i Pesca. Valencia, España. Available at: http://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/1337161080melon_baja.pdf.

Ren, X., Ci, J., Cui, X. & Yang, W. (2018) 'Doubling effect of anti-microtubule herbicides on the maize haploid', *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 30(10), pp. 903–908. doi: 10.9755/ejfa.2018.v30.i10.1828.

Roughani, A., Miri, S. M., Kashi, A. K. & Khiabani, B. N. (2017) 'Increasing the ploidy level in spinach (*Spinacia oleracea* L.) using mitotic inhibitors', *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 18(3–4), pp. 124–130.

Sauton, A. & Dumas-Vaulx, R. (1987) 'Obtention de plantes haploïdes chez le melon (*Cucumis melo* L.) par gynogenèse induite par du pollen irradié', *Agronomie*, 7(2), pp. 141–148. doi: 10.1051/agro:19870209.

Shang, J., Kong, S., Li, N., Wang, D. Z., Li, N. & Ma, S. (2020) 'Genetic mapping and localization of major QTL for bitterness in melon (*Cucumis melo* L.)', *Scientia Horticulturae*, 266(February). doi: 10.1016/j.scienta.2020.109286.

Smith, R. H. (2013a) *Explant Preparation, Plant Tissue Culture*. doi: 10.1016/B978-0-12-415920-4.00004-9.

Smith, R. H. (2013b) 'Haploid Plants from Anther Culture', *Plant Tissue Culture*, pp. 103–112. doi: 10.1016/B978-0-12-415920-4.00009-8.

Smith, R. H. (2013c) 'Media Components and Preparation', *Plant Tissue Culture*, pp. 31–43. doi: 10.1016/B978-0-12-415920-4.00003-7.

Solmaz, I., Sari, N., Gürsoy, S. & Kasapoglu, S. (2011) 'Comparison of in vivo and in vitro colchicine application for production of dihaploid "kirkagac" and "yuva hasanbey" melons', *African Journal of Biotechnology*, 10(70), pp. 15717–15724. doi: 10.5897/AJB11.2445.

Sorntip, A., Poolsawat, O., Kativat, C. & Tantasawat, P. A. (2017) 'Gynogenesis and doubled haploid production from unpollinated ovary culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.)', *Canadian Journal of Plant Science*, 98(2), pp. 353–361. doi: 10.1139/CJPS-2017-0112

Thakur, H., Sharma, S. & Thakur, M. (2019) 'Recent trends in muskmelon (*Cucumis melo* L.) research: an overview', *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. Taylor & Francis, 94(4), pp. 533–547. doi: 10.1080/14620316.2018.1561214.

Touchell, D. H., Palmer, I. E. & Ranney, T. G. (2020) 'In vitro Ploidy Manipulation for Crop Improvement', *Frontiers in Plant Science*, 11(June), pp. 1–11. doi: 10.3389/fpls.2020.00722.

UN Comtrade Database (2018). <https://comtrade.un.org/>.

Van der Veken, J., Eeckhaut, T., Baert, J., Ruttink, T., Maudoux, O., Webrouck, S. & Van Huylenbroeck, J. (2019) 'Cichorium intybus L. × Cicerbita alpina Walbr.: doubled haploid chicory induction and CENH3 characterization', *Euphytica*. Springer Netherlands, 215(7), pp. 1–13. doi: 10.1007/s10681-019-2435-0.

Vural, G. E. & Ari, E. (2020) 'Triple synergistic effect of maltose, silver nitrate and activated charcoal on high embryo yield of eggplant (*Solanum melongena* L.) anther cultures', *Scientia Horticulturae*. Elsevier, 272(May), p. 109472. doi: 10.1016/j.scienta.2020.109472.

Wang, G. F., Qin, H. Y., Sun, D., Fan, S. T., Yang, Y. M., Wang, Z. X., Xu, P. L., Zhao, Y., Liu, Y. X. & Ai, J. (2018) 'Haploid plant regeneration from hardy kiwifruit (*Actinidia arguta* Planch.) anther culture', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer Netherlands, 134(1), pp. 15–28. doi: 10.1007/s11240-018-1396-7.

Wang, K., He, L., Yan, H. & Wei, X. (2015) 'Induction of tetraploidy with antimicrotubule agents in oriental melon (*Cucumis melo* var. Makuwa)', *Israel Journal of Plant Sciences*, 62(3), pp. 198–207. doi: 10.1080/07929978.2015.1067411.

Wang, S. M., Lan, H., Jia, H. H., Xie, K. D., Wu, X. M. & Chen C. L. (2016) 'Induction of parthenogenetic haploid plants using gamma irradiated pollens in "Hirado Buntan" pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osbeck)', *Scientia Horticulturae*. Elsevier B.V., 207, pp. 233–239. doi: 10.1016/j.scienta.2016.05.028.

Warchoł, M., Czyczyło-Mysza, I., Marcinska, I., Dziurka, K., Noga, A., Kaploniak, K., Pilipowicz, M. & Skrzypek, E. (2019) 'Factors inducing regeneration response in oat (*Avena sativa* L.) anther culture', *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 55(5), pp. 595–604. doi: 10.1007/s11627-019-09987-1.

Watts, A. Kumar, V., Raipuria, R. K. & Bhattacharya, R. C. (2018) 'In Vivo Haploid Production in Crop Plants: Methods and Challenges', *Plant Molecular Biology Reporter*, 36(5–6), pp. 685–694. doi: 10.1007/s11105-018-1132-9.

Yashiro, K., Hosoya, K., Kuzuya, M. & Tomita, K. (2002) 'Efficient production of doubled haploid melon plants by modified colchicine treatment of parthenogenetic haploids', *Acta Horticulturae*, 588, pp. 335–338. doi: 10.17660/ActaHortic.2002.588.54.

Zhang, H. J., Gao, P., Wang, X. Z. & Luan, F. S. (2014) 'An efficient regeneration protocol for Agrobacterium-mediated transformation of melon (*Cucumis melo* L.)', *Genetics and Molecular Research*, 13(1), pp. 54–63. doi: 10.4238/2014.January.8.4.

Zhang, T., Ding, Z., Liu, J., Qiu, B. & Gao, P. (2020) 'QTL mapping of pericarp and fruit-related traits in melon (*Cucumis melo* L.) using SNP-derived CAPS markers', *Scientia Horticulturae*. Elsevier, 265(February), p. 109243. doi: 10.1016/j.scienta.2020.109243.

Zhu, Y. C., Sun, D. X., Deng, Yun., Li, W. H., An, G. L., Li, Y. Y., Si, J. W. & Liu, J. L. (2018) 'Effects of medium addition on ovule enlargement of watermelon non-pollinated ovary', *International Journal of Agriculture and Biology*, 20(10), pp. 2312–2318. doi: 10.17957/IJAB/15.0783.

Zieliński, K., Krewska, M., Zur, I., Juzon, K., Przemyslaw, K., Nowicka, A., Moravčková, J., Skrzypek, E. & Dubas, E. (2020) 'The effect of glutathione and mannitol on androgenesis in anther and isolated microspore cultures of rye (*Secale cereale* L.)', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer Netherlands, 140(3), pp. 577–592. doi: 10.1007/s11240-019-01754-9.

Zou, T., Su, H. N., Wu, Q. & Sun, X. W. (2018) 'Haploid induction via unfertilized ovary culture in watermelon', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer Netherlands, 135(2), pp. 179–187. doi: 10.1007/s11240-018-1454-1.

Zou, T., Song, H., Chu, X., Tong, L., Liang, S., Gong, S., Yang, H. & Sun, X. (2020) 'Efficient induction of gynogenesis through unfertilized ovary culture with winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.)', *Scientia Horticulturae*. Elsevier, 264(November 2019), p. 109152. doi: 10.1016/j.scienta.2019.109152.

7. Anexos

Tabla I- Número de explantes iniciales, brotes, plantas regeneradas y plantas dobles haploides expresadas en valores absolutos. Los datos se agruparon en base a 4 criterios diferentes: los tratamientos, las líneas, el antimitótico y tiempo de incubación del antimitótico. Las abreviaciones C1-C3, hacen referencia a las concentraciones de Colchicina 0.5, 1 y 2 mM respectivamente. Las abreviaciones A1-A3, hacen referencia a las concentraciones de APM 0.05, 0.1 y 0.25 mM respectivamente.

	Explantes Iniciales	Brotes obtenidos	Plantas regeneradas	Plantas dobles haploides
C1 44h	80	44	19	3
C2 44h	80	42	19	-
C3 44hh	80	27	13	1
A1 44h	80	36	21	-
A2 44h	80	32	22	-
A3 44h	80	16	7	-
C1 140h	80	31	17	1
C2 140h	80	30	13	-
C3 140h	80	24	9	-
A1 140h	80	23	15	1
A2 140h	80	26	17	1
A3 140h	80	9	5	1
M13-8	240	41	18	2
KR-3	240	144	98	1
Cd-1	240	59	35	3
A2-2	240	96	26	2
Colchicina	480	196	90	5
APM	480	144	87	3
44h	480	196	101	4
140h	480	144	76	4

Tabla II- Rangos de ploidía de las plantas regeneradas. Se muestran los rangos de ploidía separados por variedades y para el total de cada tratamiento.

Tratamiento: Colchicina 44h Concentración (mM)						Tratamiento: Colchicina 140 h Concentración (mM)							
H	n>2n	n=2n	2n>n	DH		H	n>2n	n=2n	2n>n	DH			
0,5						0,5							
	<i>M13-8</i>	-	-	-	-	1		<i>M13-8</i>	1	-	1	-	-
	<i>KR-3</i>	6	-	1	1	1		<i>KR-3</i>	4	2	4	-	-
	<i>Cd-1</i>	5	1	-	-	1		<i>Cd-1</i>	2	-	-	1	1
	<i>A2-2</i>	2	-	-	-	-		<i>A2-2</i>	-	-	1	-	-
TOTAL		13^A	1^A	1^A	1	3^A	TOTAL		7^A	2^A	6^A	1^A	1
1						1							
	<i>M13-8</i>	2	-	-	-	-		<i>M13-8</i>	-	-	1	-	-
	<i>KR-3</i>	12	1	-	-	-		<i>KR-3</i>	4	1	2	2	-
	<i>Cd-1</i>	1	-	-	-	-		<i>Cd-1</i>	1	-	1	-	-
	<i>A2-2</i>	1	1	1	-	-		<i>A2-2</i>	-	-	1	-	-
TOTAL		16^A	2^A	1^A	-	-	TOTAL		5^A	1^A	5^A	2^A	-
2						2							
	<i>M13-8</i>	2	-	-	-	-		<i>M13-8</i>	-	-	-	1	-
	<i>KR-3</i>	8	1	-	-	-		<i>KR-3</i>	4	1	-	2	-
	<i>Cd-1</i>	-	1	-	-	-		<i>Cd-1</i>	1	-	-	-	-
	<i>A2-2</i>	-	-	-	-	1		<i>A2-2</i>	-	-	-	-	-
TOTAL		10^A	2^A	-	-	1^A	TOTAL		5^A	1^A	-	3^A	-
Tratamiento: APM 44h Concentración (mM)						Tratamiento: APM 140 h Concentración (mM)							
H	n>2n	n=2n	2n>n	DH		H	n>2n	n=2n	2n>n	DH			
0,05						0,05							
	<i>M13-8</i>	2	-	1	-	-		<i>M13-8</i>	-	-	-	-	-
	<i>KR-3</i>	3	3	1	2	-		<i>KR-3</i>	2	3	3	-	-
	<i>Cd-1</i>	3	-	-	-	-		<i>Cd-1</i>	4	-	-	-	-
	<i>A2-2</i>	4	1	1	-	-		<i>A2-2</i>	-	2	-	-	1
TOTAL		12^A	4^A	3^A	2	-	TOTAL		6^A	5^A	3^A	-	1^A
0,1						0,1							
	<i>M13-8</i>	-	2	1	-	-		<i>M13-8</i>	-	-	1	-	1
	<i>KR-3</i>	6	1	1	-	-		<i>KR-3</i>	4	1	3	1	-
	<i>Cd-1</i>	3	-	1	-	-		<i>Cd-1</i>	3	-	-	1	-
	<i>A2-2</i>	5	2	-	-	-		<i>A2-2</i>	-	-	1	1	-
TOTAL		14^A	5^A	3^A	-	-	TOTAL		7^A	1^A	5^A	3^A	1^A
0,25						0,25							
	<i>M13-8</i>	-	1	-	-	-		<i>M13-8</i>	-	-	-	-	-
	<i>KR-3</i>	4	-	-	-	-		<i>KR-3</i>	-	-	2	1	-
	<i>Cd-1</i>	1	-	1	-	-		<i>Cd-1</i>	1	-	-	-	1
	<i>A2-2</i>	-	-	-	-	-		<i>A2-2</i>	-	-	-	-	-
TOTAL		5^A	1^A	1^A	-	-	TOTAL		1^A	-	2^A	1^A	1^A